

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2018

2018 / TOU3 / 2007

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue

par

MIRAL Alice

**HELICHRYSUM ITALICUM ET SES MICROMYCETES
ENDOPHYTES : DIVERSITÉ ET BIOTRANSFORMATIONS**

Le 2 Mars 2018

Directeur de thèse : VANSTEELANDT Marieke

JURY

Président : FABRE Nicolas

1^{er} assesseur : VANSTEELANDT Marieke

2^{ème} assesseur : BUISSON Didier

3^{ème} assesseur: BOURDY Geneviève

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 17 février 2017

Professeurs Emérites

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
Mme FOURASTÉ I.	Pharmacognosie
M. MOULIS C.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SIÉ P.	Hématologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CHATELUT E.	Pharmacologie
M. FAVRE G.	Biochimie
M. HOUIN G.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
Mme BARRE A.	Biologie
Mme BAZIARD G.	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S.	Mathématiques – Biostat.
Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme DOISNEAU-SIXOU S.	Biochimie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E.	Pharmacologie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SÉGUI B.	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique	Mme ARÉLLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme DE MAS MANSAT V. (*)	Hématologie	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
Mme GANDIA-MAILLY P. (*)	Pharmacologie	M. BERGÉ M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique	Mme BON C.	Biophysique
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique	M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique	Mme BOUTET E. (*)	Toxicologie - Sémiologie
Mme SÉRONIE-VIVIEN S.	Biochimie	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	Mme CABOU C.	Physiologie
		Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS-VIATGE C.	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		M. DELCOURT N.	Biochimie
		Mme DERAÈVE C.	Chimie Thérapeutique
		Mme ÉCHINARD-DOUIN V.	Physiologie
		Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F.	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
		Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
		Mme LEFEVRE L.	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MIREY G. (*)	Toxicologie
		Mme MONFERRAN S.	Biochimie
		M. Olichon A.	Biochimie
		PEM. PERE D.	Pharmacognosie
		Mme PORTHE G.	Immunologie
		Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*)	Chimie Analytique
		M. Sainte-Marie Y.	Physiologie
		M. Stigliani J-L.	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
		Mme TOURRETTE A.	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires	
Mme COOL C.	Physiologie
Mme FONTAN C.	Biophysique
Mme KELLER L.	Biochimie
Mme PALUDETTO M.N.	Chimie thérapeutique
M. PÉRES M.	Immunologie
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique

Ilargian diren aingerueri,
Ene famili maiteari,
Ene lagun goxoeri.

A Madame Marieke Vansteelandt,

Pour avoir accepté de reprendre la direction de cette thèse avec enthousiasme et bienveillance, votre disponibilité, le partage de vos connaissances, votre esprit critique et vos conseils avisés qui ont permis l'aboutissement avec sérénité de cette thèse.

A Monsieur Nicolas Fabre,

Pour avoir accepté de présider ce jury et ses anecdotes sur la Suze et le Schweppes (qui font d'ailleurs bon mélange...) en cours.

A Madame Geneviève Bourdy,

Pour sa présence dans ce jury, sa sympathie, son encadrement et son aide en ce début de thèse.

A Monsieur Didier Buisson,

Pour sa venue de Paris, pour son attention à mon égard depuis notre rencontre, son aide et ses précieux conseils lors du stage de Master 2, sa disponibilité, son humour et sa jovialité mais surtout pour m'avoir éveillée aux joies profondes de la Recherche Scientifique.

LISTE DES TABLEAUX	11
LISTE DES FIGURES	12
LEXIQUE	17
INTRODUCTION	19
PARTIE I : <i>Helichrysum italicum</i>	23
1. Caractéristiques de la famille des Asteraceae	23
2.1 Généralités	23
2.2 Description botanique	24
2. Généralités sur le genre <i>Helichrysum</i>	25
3. <i>Helichrysum italicum</i> ou Immortelle d'Italie	25
2.1 Description botanique	26
2.2 Répartition géographique de l'Immortelle d'Italie	27
2.3 Huile essentielle et chémotypes	27
2.4 Intérêts thérapeutiques d' <i>Helichrysum</i>	30
3.4.1 Utilisation d' <i>Helichrysum</i> à travers les temps	30
3.4.2 Activité anti-inflammatoire	33
3.4.3 Activité antimicrobienne	35
3.4.4 Activité anti-oedémateuse	36
3.4.5 Utilisation d' <i>Helichrysum</i> en dermatologie et en cosmétique	37
PARTIE II : Micro-organismes endophytes	42
1. Histoire des définitions d'endophytes	43
2. Endophytisme	44
2.1 Modes de transmission	48
2.1.1 Transmission verticale	49
2.1.2 Transfert horizontal	49
2.2 Classifications des endophytes fongiques	50
2.2.1.C – endophytes	51
2.2.2.NC – endophytes	53
2.3 Endophytes fongiques : source de composés bioactifs	55
2.3.1.Biosourcing des endophytes	56
2.3.2.Familles de composés naturels produits par les endophytes	57
2.3.3.Métabolites issus des endophytes et présentant un intérêt pharmacologique	58

PARTIE III : Biotransformations microbiennes	72
1. Biotransformations : généralités	72
2.1 Hydroxylation	73
2.2 Sulfoxydation	74
2.3 Epoxydation	75
2.4 Réaction de Baeyer – Villiger	75
2.5 Déracémisation	76
2.6 Réductions stéréo- et énantiosélectives des cétones	77
2.7 Oxydation	78
2.8 Applications possibles des transformations microbiennes	80
2.9 Conclusion	82
2. Biotransformations réalisées par les endophytes des métabolites de la plante hôte	83
3. Conclusion.....	92
PARTIE IV : <i>Helichrysum italicum</i>, diversité des micro-organismes endophytes et biotransformations	94
I. Matériels et méthodes	95
1. Endophytes : isolement et caractérisation	95
1.1. Récolte et isolement des endophytes à partir d' <i>Helichrysum italicum</i>	95
1.2. Caractérisation des endophytes	96
1..1 Extraction de l'ADN fongique	96
1.2 PCR.....	96
2. Cultures fongiques	98
2.1. Etudes des conditions de culture des micro-organismes endophytes	98
2.1.1.Optimisation des milieux de culture des endophytes	98
2.2 Etude préliminaire de l'activité antifongique de l'huile essentielle.....	99
3. Bioconversions des composés isolés de l'huile essentielle par les endophytes	100
II. Résultats et discussions	103
1. Endophytes : séquençage	103
2. Résultats des cultures fongiques	105
2.1 Etude des conditions de culture des micro-organismes endophytes	105
2.1.1 Optimisation des milieux de culture des endophytes	105
2.2 Etude préliminaire de l'activité antifongique de l'huile essentielle.....	106

2.2.1 Bilan	107
3. Résultats des bioconversions des composés isolés de l'huile essentielle par les endophytes de la plante	108
2.1 Bioconversion de la fraction enrichie en esters de néryle	108
2.2 Bioconversion de la fraction enrichie en β -dicétones	110
CONCLUSION	116
BIBLIOGRAPHIE	119

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : composition chimique relative des huiles essentielles d' <i>Helichrysum italicum</i> en fonction de leur origine.	29
Tableau 2 : composition chimique (%) des huiles essentielles d' <i>H. italicum</i> de la côte corse en fonction du stade d'évolution de la plante.....	30
Tableau 3 : composés chimiques principaux retrouvés dans les différents extraits d' <i>Helichrysum italicum</i>	32
Tableau 4 : critères symbiotiques utilisés pour caractériser les différentes classes d'endophytes fongiques.....	50
Tableau 5 : quelques classes de molécules produites par les endophytes.....	58
Tableau 6 : liste des endophytes fongiques capables de produire du paclitaxel	61
Tableau 7 : liste des endophytes fongiques produisant de la podophyllotoxine	65
Tableau 8 : brevets déposés de biotransformations réalisés par <i>Pseudomonas</i> spp et d'intérêt industriel.....	74
Tableau 9 : résultats de la bioréduction du benzoyl acétonitrile (5a) et du 3-chloropropriophénone (6a).....	78
Tableau 10 : synthèse des biotransformations de BOA et HBOA	87
Tableau 11 : test de croissance mycélienne des cultures fongiques	87
Tableau 12 : amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage	97
Tableau 13 : composition des fractions de l'huile essentielle d'Immortelle	100
Tableau 14 : résultats du séquençage d'ADN des endophytes isolés	103
Tableau 15 : comparaison des cultures des isolats sur deux milieux différents.	105
Tableau 16 : Activité antifongique de l'huile essentielle d' <i>H. italicum</i>	106

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : cladogramme de l'APG IV	23
Figure 2 : Immortelle d'Italie	26
Figure 3 : feuilles d'Immortelle	26
Figure 4 : fleurs d'Immortelle	27
Figure 5 : hydrodistillation	28
Figure 6 : distillation par entrainement à la vapeur d'eau	28
Figure 7 : métabolisme de l'acide arachidonique.....	33
Figure 8 : arzanol.....	34
Figure 9 : inhibition de l'activité du 5-LO	34
Figure 10 : résultats obtenus dans chaque milieu différent après 10 jours d'incubation	39
Figure 11 : résultats de l'analyse quantitative des anastomoses établies dans le réseau tubulaire	40
Figure 12 : antagonisme équilibré	45
Figure 13 : différences de (a) résistance à la maladie due au pathogène <i>Phytophthora capsici</i> , (b) tolérance à la sécheresse des pousses de pastèque et (c) amélioration de la croissance des plants de tomates entre les plantes colonisées par les endophytes et les plantes contrôles, donc non colonisées	47
Figure 14 : modes de transmission observés chez les endophytes fongiques	48
Figure 15 : classes d'endophytes en fonction des tissus colonisés	51
Figure 16 : différentes stratégies utilisées en bioprospection	56
Figure 17 : structure du paclitaxel.....	62
Figure 18 : destin cellulaire en réponse à un agent anti-mitotique.....	62
Figure 19 : mode d'action du taxol	63
Figure 20 : structure de la podophyllotoxine	64
Figure 21 : structures de l'hypéricine et de l'émodine	66
Figure 22 : spectres ESI-MS/MS d'hypéricine et d'émodine, mode d'ionisation négatif haute résolution	67
Figure 23 : effet des extraits d'endophytes fongiques sur la réplication du VIH-1	69
Figure 24 : biotransformation de l'acide benzhydrylsulfanyle acétique par <i>Beauveria bassiana</i>	75
Figure 25 : mécanisme de la réaction de Baeyer – Villiger	75

Figure 26 : réduction d'une cétone en alcool	77
Figure 27 : chromatogrammes GC – FID des mélanges post-réactionnels de l' α -pinène.....	79
Figure 28 : chromatogrammes HPLC de la biotransformation du furosémide	81
Figure 29 : biotransformations par <i>P. variable</i> des flavonoïdes glycosylées (1-3) isolées de l'extrait brut de <i>C. harringtonia</i> et structures aglycones obtenues (4,5).....	84
Figure 30 : longueurs des hyphes (mm) à partir des spores de <i>P. variable</i> en présence de flavonoïdes glycosylées (1-3) et des aglycones (4,5).....	85
Figure 31 : structures des benzoxazinoïdes isolés à partir d' <i>Aphelandra</i> sp	86
Figure 32 : pourcentage des différents groupes de composés chimiques de l'huile essentielle d' <i>Eupatium buniifolium</i> obtenue par hydrodistillation	89
Figure 33 : comparaison des différents pourcentages des différents groupes chimiques de (A) l'huile essentielle d' <i>Eupatium buniifolium</i> incubée avec (B) <i>F. solani</i> Eb01, (C) <i>A. alternata</i> (Eb03) et (D) <i>Neofusicoccum</i> sp. Eb04	90
Figure 34 : comparaison entre les profils GC – FID de l'huile essentielle d' <i>Eupatium buniifolium</i> (b) et de sa biotransformation par <i>F. solani</i> Eb01	92
Figure 35 : comparaison entre les profils GC – FID de l'huile essentielle d' <i>Eupatium buniifolium</i> (b) et de sa biotransformation par <i>A. alternata</i> Eb03.....	92
Figure 36 : comparaison entre les profils GC – FID de l'huile essentielle d' <i>Eupatium buniifolium</i> (b) et de sa biotransformation par Eb04.....	93
Figure 37 : (a) boîte de pétri (90x15mm) contenant du PDA et feuilles d'Immortelle	96
Figure 38 : diagramme schématique d'un cluster de gènes d'ADNr fongique	98
Figure 39 : étapes de la PCR et cycles thermiques	99
Figure 40 : test des microatmosphères sur <i>Truncatella helichrysi</i>	108
Figure 41 : Chromatogramme de la fraction F4 esters de néryle avant biotransformation...	111
Figure 42 : Chromatogramme de la fraction F4 esters de néryle après biotransformation par <i>Alternaria alternata</i>	111
Figure 43 : Chromatogramme de la fraction enrichie en β -dicétones avant biotransformation	112
Figure 44 : (a) agrandissement du chromatogramme de la fraction enrichie en β -dicétones avant biotransformation par <i>Alternaria alternata</i> , (b) agrandissement du chromatogramme de la fraction enrichie en β -dicétones après biotransformation.	113
Figure 45 : spectre de masse de la 4,6,9-triméthyl-déc-8-èn-3,5-dione	114

Figure 46 : spectre de masse de la molécule obtenue après biotransformation de la 4,6,9-triméthyl-déc-8-èn-3,5-dione par <i>Alternaria alternata</i>	114
Figure 47: (a) chromatogramme de la fraction enrichie en β -dicétones avant incubation avec <i>Penicillium murcianum</i> . (b) chromatogramme de la fraction enrichie en β -dicétones après incubation avec <i>Penicillium murcianum</i>	116
Figure 48 : spectre de masse de la 4,6-diméthyl-octan-3,5-dione	116
Figure 49 : spectre de masse de la nouvelle molécule après biotransformation de la 4,6,9-triméthyl-déc-8-èn-3,5-dione par <i>Penicillium murcianum</i>	117

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

LTs : Leucotriènes
AA : Acide Arachidonique
COX : Cyclooxygénase
5 – LO : 5 – Lipoosygénase
AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
PG : Prostaglandines
CH₂Cl₂ : Dichlorométhane
EtOAc : Acétate d'éthyle
BuOH : Buthanol
DMSO : Diméthylsulfoxyde
CaCl₂ : Chlorure de calcium
ATP : Adénosine triphosphate
PLA₂ : Phospholipase A₂
UVB : Ultraviolet B
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
L – Glu : L - acide glutamique
DSE : Dark Septate Endophyte
GTP : Guanosine triphosphate
ESI – MS/MS : electrospray ionization tandem mass spectrometry
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
SIDA : Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
LT : Lymphocytes T
AZT : Azidothymidine
TI : Transcriptase Inverse
PUR : Polyuréthane
VOC : Volatile organic compound
PDA : Potato Dextrose Agar
ADN : Acide désoxyribonucléique
MEA : Malt Extract Agar
PCR : Polymerase Chain Reaction

ITS : Internal Transcribed Spacer

MgCl₂ : Chlorure de magnésium

dNTP : désoxyribonucléotide

HI : *Helichrysum italicum*

GC – MS : Gas chromatography – mass spectrometry

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

MEGA : Molecular Evolutionary Genetics Analysis

LEXIQUE

Actinomorphe : se dit d'une fleur dont la symétrie est axiale.

Akène : fruit sec indéhiscent à une seule graine.

Alternes : se dit des feuilles isolées et disposées alternativement de part et d'autre de la tige, au niveau des nœuds.

Angiospermes : plantes spermaphytes caractérisées entre autres par la présence de fleurs, du carpelle (donc du fruit) et d'une double fécondation aboutissant à la formation d'un albumen triploïde.

Anthère : corps globuleux contenant les deux loges polliniques constituant la partie supérieure de l'étamine.

Bractées : feuilles particulières par leur forme et leur couleur à l'aisselle desquelles naissent les fleurs.

Calice : enveloppe périanthaire la plus externe de la fleur constituée par les sépales.

Campanulée : qui a la forme d'une cloche

Capitule : inflorescence indéfinie où l'axe principal est dilaté au sommet du pédoncule floral pour former un plateau portant des fleurs sessiles

Contusée : se dit d'une plante broyée ; pilée

Décomposées : quand au lieu d'être simples et de porter immédiatement les folioles comme dans les feuilles dites composées, le pétiole commun se divise en pétioles secondaires, où sont insérées les folioles

Epibiotique : vivant à la surface d'un substrat sans en dépendre

Epigyne : pièce florale paraissant insérée sur l'ovaire

Foliole : chaque division du limbe d'une feuille composée

Hermaphrodite : fleur possédant à la fois des étamines et des carpelles fonctionnels ; plante dioïque, plante où pied femelle et pied mâle sont retrouvés.

Infère : qualifie l'ovaire d'une fleur lorsqu'il s'insère au-dessous du point d'insertion des autres pièces florales.

Involucre : ensemble des bractées disposées en verticille à la base d'une ombelle ou d'un capitule.

Liguliflore : des fleurs ligulées, en forme de languettes.

Lobées : divisées en plusieurs lobes (parties arrondies séparées par des sillons).

Opposées : se dit de feuilles disposées deux par deux, face à face, au niveau des nœuds de la tige

Palmée : ou digitée, feuilles divisée en segments rayonnant, disposés comme les doigts de la main.

Pennée : deux rangs de folioles disposés le long de la nervure primaire.

Périanthe : ensemble des enveloppes de la fleur, généralement composé du calice et de la corolle.

Propagule : structure de dissémination (propagation) et de reproduction.

Radiée : se dit des capitules comprenant des fleurons centraux, entourés d'une couronne de fleurs ligulées.

Réceptacle floral : constitué par l'extrémité plus ou moins élargie du pédoncule floral sur laquelle sont insérées les pièces florales formant dans une fleur complète, quatre verticilles superposés : le calice (sépalés), la corolle (pétales), l'androcée (étamines) et le pistil ou gynécée (formé d'un ou plusieurs carpelles).

Sépale : partie ou division du calice de la fleur, généralement de couleur verte.

Simple : lorsque le limbe de la feuille est composé d'une seule pièce, les bords non dentés.

Stomate : orifice de petite taille présent dans l'épiderme des organes aériens végétaux.

Sous – frutescente : se dit d'une plante dont la partie inférieure de la tige est ligneuse.

Tomentum : désigne un duvet plus ou moins dense, formé de poils dressés et très courts.

Tubilifore : qui a des fleurs en forme de tubes.

Uniloculaire : élément à une seule loge.

Verticillées : se dit des feuilles réunies par trois ou plus, en cercle autour de la tige, au niveau des nœuds.

Zygomorphe : symétrique par rapport au plan.

INTRODUCTION

Les études paléanthropologiques ont montré que, déjà, l'Homme de Neandertal il y a 60000 ans utilisait les plantes pour se soigner comme le suggère la découverte des traces de pollen dans des grottes des montagnes du Zagros en Iraq [1]. Alors que de nombreuses cultures, chinoise [2], thaïlandaise [3], nord-coréenne [4], gabonaise [5][6] font toujours appel aux remèdes ancestraux faute d'accès à la médecine moderne, par traditions ou par choix [7], les pays occidentaux, eux, se sont tournés vers la synthèse chimique et les biotechnologies détrônant ainsi la Nature.

Aujourd'hui, suite aux nombreux scandales sanitaires (notamment ceux du Distilbène et du Médiator ou encore le sang contaminé et l'amiante) dénoncés de manière très médiatisée [8], une volonté certaine d'un « retour aux sources », d'une conservation de notre environnement et de traitements à base de produits plus naturels créent un nouvel engouement pour des thérapeutiques plus naturelles telles la phytothérapie et l'aromathérapie et relancent chercheurs et pharmaciens sur des pistes tournées vers la Nature [9][10]. Ainsi, de plus en plus de recherches sur les plantes sont réalisées permettant de réactualiser des espèces comme l'Immortelle d'Italie qui présente de nombreuses vertus longtemps oubliées et aujourd'hui retrouvées [11][12].

L'Immortelle d'Italie appartient à la famille des Asteraceae. Étymologiquement son nom scientifique *Helichrysum italicum*, venant du Grec « Helios », soleil, « Khrusos », or et « italicum », Italie, veut dire « soleils d'or d'Italie » [13]. Cette dénomination rappelle à la fois la couleur jaune des fleurs et le pays où la plante a été initialement décrite. Plus couramment appelée « Immortelle » en français ou « Everlasting flower » en anglais pour ses fleurs qui ne fanent pas, cette plante possède une signification particulière dans la culture chinoise. En effet, elle symbolise une vie longue et prospère à l'image de la longévité exceptionnelle des bouquets. On pourra également citer comme anecdote qu'en 1952, lors du couronnement de la reine d'Angleterre Elisabeth II, des bouquets d'Immortelle ont été utilisés pour symboliser la pérennité de son règne.

L'Immortelle couvre la quasi-totalité de l'île de Beauté. Elle est retrouvée autant sur le littoral que dans l'intérieur des terres et en montagne jusqu'à 1 400 m d'altitude. Elle dégage une forte odeur de curry qui donne au maquis corse son identité olfactive faisant dire à Napoléon, « que l'odeur du sol même lui eût suffi pour deviner la Corse les yeux fermés ».

Appelée « murza » par les insulaires, cette plante était utilisée pour brûler les soies de porcs lors de la cochonnaille. Les enfants la cueillaient également et la brûlaient à la Saint-Jean parce qu'elle chauffe peu, comme l'affirme le dicton « focu di murza ùn ghjova à nimu », le feu d'immortelle ne sert à personne sauf peut-être à éloigner les sorciers [14].

Au-delà de ces usages traditionnels et anecdotiques l'Immortelle était largement utilisée pour ses nombreuses propriétés thérapeutiques [15]. En effet, grâce à ses vertus purificatrices, lorsque des épidémies éclataient, elle était brûlée pour « chasser les microbes » et assainir l'air. Elle servait également aux inhalations contre le rhume et les bergers guérissaient les fractures de leurs bêtes en disposant un bouquet de fleurs autour de la blessure ou bien sur les fromages de manière à empêcher les mouches d'y pondre.

Son huile essentielle, quant à elle, appliquée en massage, réduit les hématomes et favorise la circulation sanguine [16]. Pline l'Ancien décrivait ses nombreuses propriétés thérapeutiques dans son ouvrage « Histoire Naturelle » : *« pris avec du vin, il est diurétique et emménagogue ; il résout les duretés et les inflammations ; avec du miel, on en fait un topique pour les brûlures ; en potion, on l'emploie contre la morsure des serpents et les douleurs lombaires ; avec du vin miellé, il fond le sang caillé dans le ventre ou la vessie. Les feuilles broyées, à la dose de trois oboles dans du vin blanc, arrêtent les pertes chez les femmes. »* [17].

Aujourd'hui, l'Immortelle de Corse est très utilisée en cosmétologie [18][19] grâce à ses nombreuses activités : elle active la microcirculation sanguine et la régénération cellulaire mais c'est aussi un excellent anti-radicalaire. L'Occitane a d'ailleurs déposé 13 brevets depuis 2011 [20] dont un concernant l'activité de l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* [21].

Cette huile essentielle n'est pas seulement très prisée en cosmétologie mais elle est également au centre de nombreuses recherches rapportant le fait que c'est un excellent anti-hématome [22], un anti-inflammatoire [23][24], un antibactérien très efficace [25][26][27], un antiviral d'efficacité significative [28][29] et un antifongique [30]. Ses propriétés peuvent être utilisées dans des pathologies aussi diverses que les affections dermatologiques (brûlures, cicatrices, couperose, vergetures psoriasis, acné, vieillissement cutané, effet anti-érythémateux [31]), les affections circulatoires (oedèmes, varices, problèmes de circulation sanguine) et les affections respiratoires et ORL (rhinite, bronchite, allergie). Même si l'huile essentielle est plus largement utilisée en Occident, en Afrique du Sud par exemple, toutes les parties de la plante sont valorisées [32].

Comme la majorité des plantes voire toutes, l'Immortelle vit en association avec un ensemble de micro-organismes, appelé microbiome. Elle est à la fois recouverte d'épiphytes mais abrite également des endophytes. Littéralement du grec « à l'intérieur du végétal », les endophytes sont des microorganismes, bactéries ou plus communément des champignons, qui vivent en symbiose avec leur hôte.

D'après l'hypothèse de Schulz et al. en 1999, d' « antagonisme équilibré », les endophytes réussiraient à éviter à ce que la plante n'active ses défenses à leur égard, à assurer leur propre défense avant d'être neutralisés par les métabolites toxiques de leurs hôtes et à se développer à l'intérieur des plantes sans leur causer de maladies. Ainsi, si la virulence fongique et les défenses de la plante sont équilibrées, l'association des deux organismes semble être asymptomatique et non dommageable [33]. Si on se réfère à l'hypothèse de co-évolution plante – endophyte, les micro-organismes colonisateurs pourraient même aider leurs hôtes à se défendre en synthétisant des métabolites secondaires bioactifs.

Ces endophytes constituent une classe très large de micro-organismes capables de biosynthétiser des métabolites secondaires [34][35]. Par exemple, la recherche de Webber en 1981, montre que l'endophyte fongique *Phomopsis oblonga* protège les ormes contre la propagation de la maladie de l'orme néerlandais (maladie causée par le champignon *Ceratocystis ulmi*, et dont le vecteur est le coléoptère *Physocneum brevilineum*) en produisant un répulsif toxique contre ces insectes [36].

Même si cette interaction plante - endophyte semble exister depuis l'apparition des plantes supérieures sur Terre [37], ce n'est qu'au 19^{ème} siècle que cette cohabitation a été mise en évidence et nommée par de Bary. Depuis, les endophytes ont été isolés à partir de nombreuses plantes et des travaux significatifs (découverte et production de l'anti-cancéreux paclitaxel par l'endophyte *Taxomyces andreanae*) ont été menés et ont mis en évidence la production de métabolites secondaires connus ou nouveaux potentiellement utilisables en thérapeutique [38].

Les endophytes retrouvés dans les plantes peuvent réaliser bon nombre de biotransformations des métabolites secondaires de leur hôte comme, notamment, des oxydations, réductions, hydrolyses, hydroxylations. Ces modifications chimiques peuvent avoir plusieurs buts et différentes applications dans l'Industrie.

Dans ce mémoire, nous développerons d'abord l'Immortelle d'Italie d'un point de vue botanique et chimique mais également ses vertus thérapeutiques et son utilisation en cosmétiques. Dans une deuxième partie, nous présenterons l'endophytisme. Une troisième partie traitera des biotransformations réalisées par les micro-organismes et des bioconversions des métabolites secondaires réalisées par les endophytes dans les plantes hôtes. Enfin, dans une dernière partie nous détaillerons les travaux menés en stage de Master 2 au sein de deux laboratoires, l'unité des Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes, équipe de Chimie des Produits Naturels et Fongiques (CPNF) du Muséum National d'Histoire Naturelle à Paris et le laboratoire de Chimie des Produits Naturels de l'Université de Corse à Corte. Ces travaux ont porté sur l'étude des micro-organismes endophytes d'*Helichrysum italicum* du point de vue de leur diversité et de leur aptitude à biotransformer les métabolites secondaires de la plante.

PARTIE I : *Helichrysum italicum*

1. Caractéristiques de la famille des Asteraceae

2.1 Généralités

L'Immortelle d'Italie appartient à la famille des Astéracées (autrefois appelée Composées), du grec « aster » rappelant des fleurs en étoile. Cette famille, la plus importante, compte environ 23600 espèces [39].

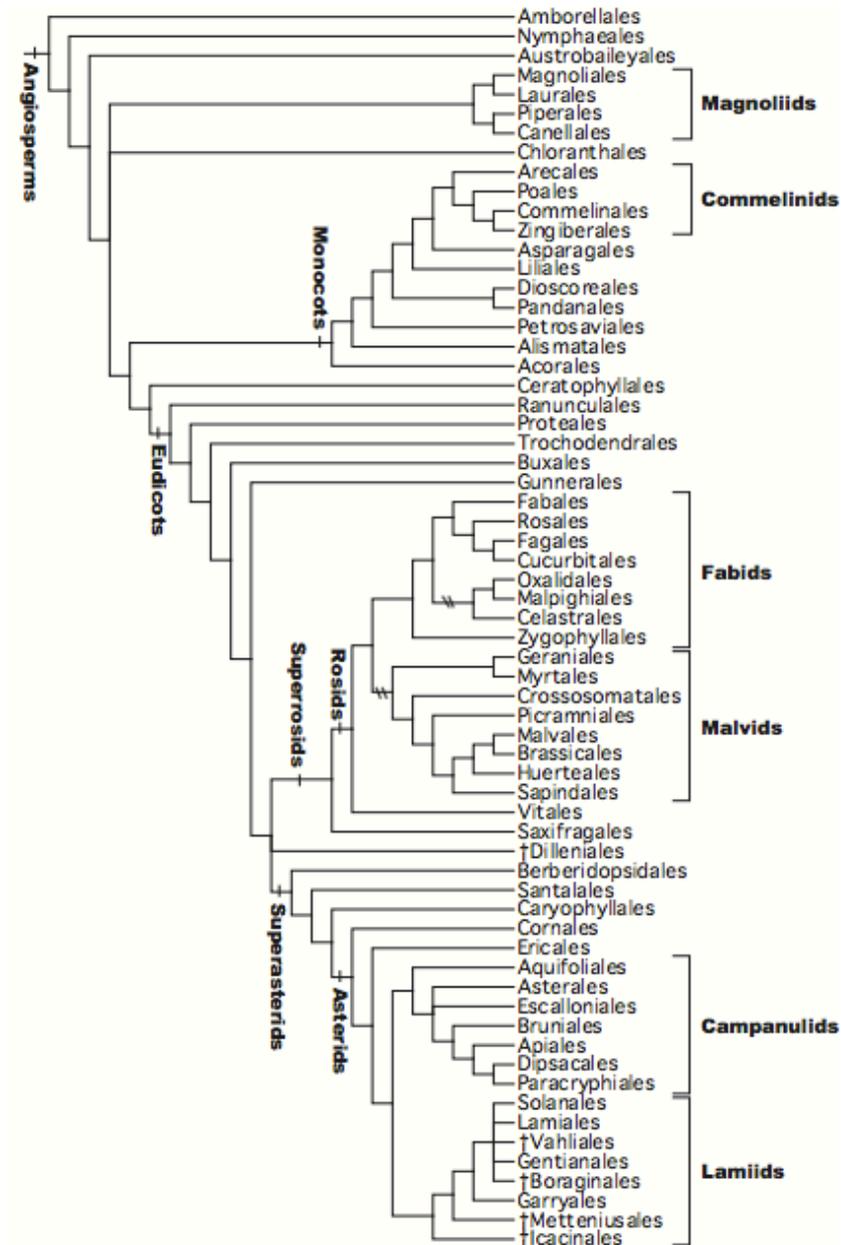


Figure 1 : cladogramme de l'APG IV [40].

Les espèces du genre *Helichrysum* sont des angiospermes dicotylédones appartenant à l'ordre des Astérales. Ce genre regroupe environ 300 espèces très largement répandues à travers le globe (Europe du Sud - Sud de la France, Corse, Sardaigne, Italie, Espagne, Grèce et les Balkans - mais également sur les continents asiatiques, africains et américains).

Les sols arides comme les pelouses rocheuses ou les garrigues sont leur habitat de prédilection [41]. L'espèce *Helichrysum italicum* est subdivisée en cinq sous-espèces : *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* Franco, *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum* (Willd.) Nyman, *Helichrysum italicum* subsp. *serotinum* (Boiss.) P.Fourn., *Helichrysum italicum* subsp. *pseudolitoreum* (Fiori) Bacch. & al. et *Helichrysum italicum* subsp. *siculum* (Jord. & Fourr.) [42].

L'Immortelle retrouvée en Corse se présente sous la forme d'un sous-arbrisseau de 30 à 60 cm de hauteur, fleurissant jaune pâle de mai à fin juillet. Seule cette partie de la plante est utilisée pour extraire l'huile essentielle. La date de la récolte doit donc avoir lieu lors de la floraison, généralement en juin.

2.2 Description botanique [43] [44] [45]

La famille des Astéracées est représentée par des plantes herbacées, des arbustes, des arbres mais aussi des lianes.

Les feuilles sont alternes, opposées ou verticillées, simples, lobées ou découpées, à bords entiers ou dentés de différentes sortes et à nervation en général pennée ou palmée.

L'appareil sécréteur est de deux types : (1) des cellules et canaux à essence, des poils sécréteurs, (2) des laticifères dont les tiges contiennent du latex comme chez les Chicorées par exemple.

Les Astéracées présentent trois caractéristiques communes : (1) les fleurs sont réunies en capitules et sont entourée par une involucre de bractées, (2) les fleurs ont des anthères soudées et un ovaire infère uniloculaire, (3) les fruits sont des akènes surmontés des restes du calice permettant sa dissémination par le vent.

La formule florale générale est : (5S) + (5P) + (5E) + (2C).

Les fleurs sont des pentamères épigynes, hermaphrodites ou unisexuées, actinomorphes ou zygomorphes. Généralement, les sépales sont absents ou réduits à des poils.

Cette famille peut être divisée en quatre sous-familles en fonction des différents types de fleurs rencontrés sous forme de capitule : (1) les tubuliflores, comme pour les chardons et la cirse, (2) les liguliflores, comme pour les pissenlits et la laitue, (3) les labiatiflores et (4) les radiées comme chez les marguerites.

La pollinisation est généralement entomophile, c'est-à-dire réalisée par les insectes.

Dans cette famille, des plantes alimentaires sont retrouvées, comme la laitue, la chicorée, l'artichaut, le tournesol par exemples.

2. Généralités sur le genre *Helichrysum*

Le genre *Helichrysum* consiste en plusieurs centaines d'espèces retrouvées partout dans le monde. Les espèces *Helichrysum* présentent un grand polymorphisme et une importante occurrence dans la région méditerranéenne d'Europe [46]. Quelques unes d'entre elles montrent une variété importante de propriétés pharmacologiques et d'autres largement utilisées en parfumerie [47].

L'involucre est campanulé, hémisphérique ou cylindrique à folioles imbriquées, colorées et luisantes, non étalées en étoile à maturité. Toutes les fleurs sont tubuleuses : celles de la circonférence extérieure sont femelles et peu nombreuses, disposées sur un seul rang et les autres sont hermaphrodites. Le réceptacle est nu.

La plupart des plantes du genre *Helichrysum* sont des plantes vivaces et presque toujours sous – frutescentes à la base (12).

3. *Helichrysum italicum* ou Immortelle d'Italie

La terminologie scientifique de l'Immortelle d'Italie, *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don, vient du fait que G. Don avait décrit pour la première fois cette espèce en 1830.

L'Immortelle d'Italie a été décrite de très nombreuses fois, mais souvent la même espèce était décrite par des chercheurs différents. Le nom accepté est *Helichrysum italicum* G. Don et possède comme synonymes les dénominations suivantes : *Helichrysum angustifolium* Lam D.C., *Gnaphalium angustifolium* Lam. et *Gnaphalium italicum* Roth (14).

2.1 Description botanique

L'immortelle d'Italie est un sous-arbrisseau atteignant 20 à 50 cm de hauteur, dressé, aromatique à rameaux anguleux (**figure 2**).



Figure 2 : Immortelle d'Italie [48].

Les feuilles (**figure 3**) sont vertes pâles sur les deux faces, grêles et allongées, elles font entre 1,5 et 3 cm de long, alternes, linéaires et très étroites, à marge enroulée en dessous. Elles présentent un léger tomentum blanchâtre. Elles sont couvertes de petites glandes blanches et brillantes.



Figure 3 : feuilles d'Immortelle.

Les fleurs (**figure 4**) sont regroupées en capitules d'un diamètre de maximum 3mm, serrés en corymbe de 1,5 à 8 cm de large. Elles présentent un périanthe tubuleux voire légèrement campanulé. Les fleurs sont tubulées jaunes et les bractées jaune doré sont

densément imbriquées, les extérieures coriaces et les intérieures plus étroites et au moins cinq fois plus longues et glanduleuses.

La floraison de l'Immortelle a lieu de juin à juillet.



Figure 4 : fleurs d'Immortelle (Marion Brunel).

2.2 Répartition géographique de l'Immortelle d'Italie

L'immortelle d'Italie est présente avec plusieurs sous-espèces en Europe du sud : sud de la France, Corse, Sardaigne, Italie, Espagne, Grèce, Balkans.

Helichrysum italicum a la capacité de pousser naturellement dans des régions européennes sèches [28] du fait que c'est une plante xérophyte c'est-à-dire qu'elle peut survivre dans des environnements manquant d'eau. Cette caractéristique permet aussi à l'Immortelle d'Italie de pousser dans une large gamme d'altitudes : entre le niveau de la mer et 2200m [49].

2.3 Huile essentielle et chémotypes

D'après la 7^{ème} édition de la Pharmacopée Européenne, une huile essentielle est définie comme étant « un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière végétale botaniquement définie, soit par entrainement à la vapeur d'eau soit par distillation sèche ou soit par un procédé mécaniquement approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. La matière première végétale peut être fraîche, flétrie, sèche, entière, contusée ou pulvérisée, à l'exception des fruits du genre *Citrus* toujours à l'état frais. »

L'huile essentielle est produite par extraction suivant différents procédés. L'hydrodistillation (**figure 5**) et l'entraînement à la vapeur d'eau (**figure 6**) sont deux techniques utilisées.

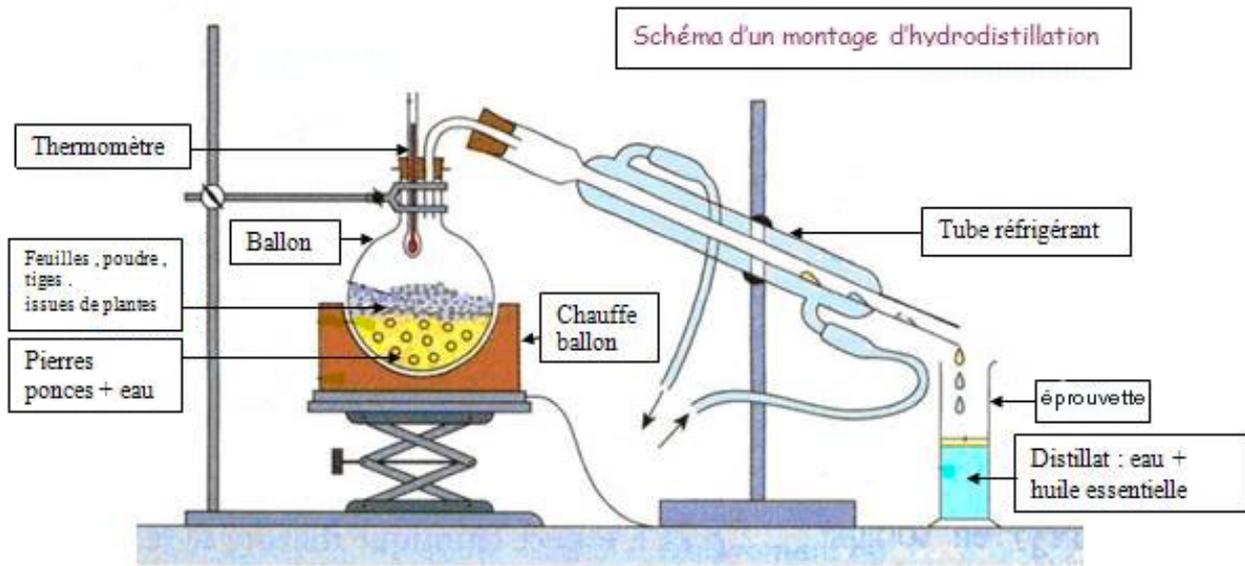


Figure 5 : hydrodistillation [50].

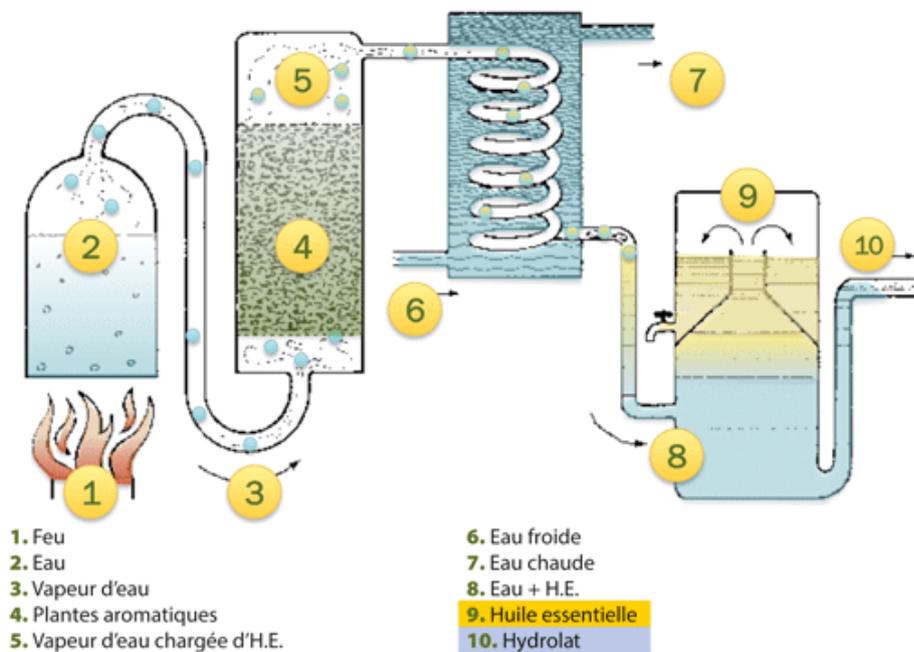


Figure 6 : distillation par entraînement à la vapeur d'eau [51].

L'huile essentielle contient des molécules aromatiques liposolubles alors que l'hydrolat contient des molécules aromatiques hydrosolubles. Les rendements réels sont faibles et en moyenne une tonne de matière végétale permet d'obtenir 2kg d'huile essentielle.

La composition de l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* montre une variabilité chimique en fonction de plusieurs facteurs comme la nature du sol, le cycle de végétation, l'environnement et les origines géographiques (**tableau 1**) [52].

Tableau 1 : composition chimique relative des huiles essentielles d'*Helichrysum italicum* en fonction de leur origine.

% Molécules	Grèce	Amérique du nord		Ex-Yougoslavie	Côte adriatique	Corse
Géranol	36					
Géranylacétate	15					
Nérolidol	12					
Nérylacétate		51	17	6	4 – 14	30 - 40
α -pinène		17		22	25 – 30	
γ -curcumène			16	10	10 – 22	4
Ar-curcumène					15 – 29	
β -sélinène				6		
β -caryophyllène				5		

Dans leurs travaux, Bianchini et al. ont montré que la variabilité du chémotype est due aux paramètres physico-chimiques (texture et acidité) de sols et au stade de récolte des plantes [53]. En effet, un sol peu graveleux et présentant des teneurs plus élevées que la moyenne en magnésium, sodium et potassium et une teneur modérée en cuivre favorisera plutôt une huile essentielle riche en acétate de néryle et β -dicétones.

De plus, le pH est un facteur clé qui influence l'assimilation des éléments par la plante. Ainsi, en fonction de l'acidité des sols sur lesquels pousse l'Immortelle, le chémotype de son huile essentielle sera différent.

Pour être vendue dans le domaine de l'aromathérapie, l'huile essentielle d'Immortelle d'Italie doit présenter une teneur en β -dicétones d'environ 5% et une teneur en acétate de néryle d'environ 35%.

Pour avoir une certaine composition chimique et répondre aux exigences légales, le moment de la récolte d'Immortelle est un moment primordial et doit avoir lieu au moment de la floraison, c'est-à-dire en juin voire début juillet. A cette période-là, la teneur en esters de néryle est la plus importante dans l'huile essentielle d'Immortelle.

Blazevic et al. ont également étudié la composition des huiles essentielles extraites à partir de plantes à différents stades de végétation. Leurs travaux ont montré que l' α -pinène est présent en quantités plus faibles pendant la floraison (4%) alors que le γ -curcumène apparaît en quantités plus importantes au même stade (28%).

Les rendements en huiles essentielles dépendent également du stade auquel est cueilli l'Immortelle [47] : dans les huiles essentielles distillées à partir de jeunes plants, les taux des cétones non terpéniques étaient plus élevés que dans les autres échantillons (**tableau 2**).

Tableau 2 : composition chimique (%) des huiles essentielles d'*H. italicum* de la côte corse en fonction du stade d'évolution de la plante [47]

Components	Date of harvest											
	Mar.	Apr.	May	June	July	Aug.	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.
	Early shoots	Corymb forming	Before flowering	Flowering	After flowering	Late summer shoots	Late summer shoots	Late summer shoots	Early shoots	Early shoots	Early shoots	Early shoots
Pentan-3-one	1.7	–	0.5	0.5	0.6	0.9	1.4	2.6	2.5	1.1	3.0	2.0
2-Methylpentan-3-one	2.6	–	0.9	0.6	0.7	1.3	1.9	3.4	3.1	2.3	3.9	3.2
4-Methylhexan-3-one	5.2	–	1.6	1.3	1.3	1.8	2.9	4.8	4.8	3.9	6.1	6.5
Limonene	2.1	1.1	3.4	2.6	1.8	1.7	1.5	1.4	1.6	1.7	2.0	1.5
3,5-Dimethylheptan-2,4-dione	2.4	1.7	0.8	0.9	0.9	1.4	1.8	2.9	2.7	2.2	2.7	2.5
Linalool	1.1	1.0	1.3	2.0	2.7	2.2	1.7	1.1	1.1	0.9	0.9	1.3
Nerol oxyde	1.8	1.4	0.6	0.5	0.6	0.7	0.8	1.0	1.2	1.4	1.2	1.5
4,6-Dimethyloctan-3,5-dione	9.5	7.3	3.3	4.0	3.7	4.8	6.7	9.0	8.9	8.5	9.9	10.3
α -Terpineol	1.8	1.6	1.8	1.6	1.9	1.8	2.1	1.0	1.2	1.1	1.0	1.8
Nerol	2.4	2.5	1.9	2.7	2.7	3.0	2.5	2.7	2.6	2.4	2.9	2.8
Neryl acetate	22.7	32.0	35.3	26.4	27.5	28.5	28.9	25.7	23.2	27.6	20.3	21.2
Italicene	0.8	1.6	1.5	1.3	1.1	1.1	0.9	1.3	1.3	1.2	1.3	1.0
4,6,9-Trimethyldec-8-en-3,5-dione	1.2	2.5	2.9	4.3	4.9	4.1	2.0	1.6	1.5	2.0	2.4	2.7
Neryl propionate	2.0	2.5	2.9	3.3	4.5	4.0	3.3	3.0	2.3	2.5	1.8	2.3
2,4,6,9-Tetramethyldec-8-en-3,5-dione	0.8	1.2	1.3	2.2	2.4	2.1	1.4	1.2	1.1	1.2	1.2	1.1
5,7,10-Trimethylundec-9-en-4,6-dione	0.6	0.9	1.0	1.8	2.2	1.9	1.5	0.9	0.9	1.0	0.9	0.9
<i>ar</i> -Curcumene	0.8	1.7	1.5	1.5	1.8	1.6	1.4	1.8	1.7	1.3	1.7	1.2
γ -Curcumene	1.4	2.9	6.0	6.6	2.6	1.5	1.0	0.9	1.9	1.1	1.5	2.0
Guaiol	0.9	1.3	1.8	1.9	1.9	1.6	1.5	1.0	1.0	1.1	0.9	1.0
Eudesm-5-en-11-ol	4.5	5.2	3.7	3.4	3.6	3.8	4.1	3.9	4.0	3.9	4.2	4.0
β -Eudesmol	3.1	3.6	2.3	2.5	2.6	2.7	2.8	2.5	2.7	3.1	2.4	2.2
α -Eudesmol	1.7	2.4	2.0	2.3	2.2	2.1	2.1	1.5	1.5	1.8	1.2	1.2
Bulnesol	0.5	0.8	1.1	1.1	0.8	0.7	0.6	0.4	0.5	0.6	0.4	0.4

2.4 Intérêts thérapeutiques d'*Helichrysum*

3.4.1 Utilisation d'*Helichrysum* à travers les temps

Les plantes du genre *Helichrysum* ont longtemps été utilisées pour leurs propriétés médicinales. Aujourd'hui encore, cette plante joue un rôle important dans la médecine traditionnelle des pays méditerranéens.

De même que l'ensemble des plantes, *Helichrysum italicum* présente des bioactivités différentes en fonction du type d'extrait utilisé et donc de sa composition chimique.

Les fleurs sèches de l'Immortelle d'Italie trouvent une application dans la médecine populaire notamment pour leurs activités anti-inflammatoires, anti-allergiques et antimicrobiennes [54] [49]. Dans les cosmétiques, *H. italicum* est surtout utilisé dans les

parfums et dans la formulation de produits phytodérivés pour protéger les peaux délicates et irritées. La présence significative de polyphénols comme les flavonoïdes connus comme de bons antioxydants jouent ce rôle de protecteur. Les activités anti-oxydantes d'extraits des parties aériennes d'*H. italicum* ont été établies dans de nombreux modèles *in vivo* et *in vitro* [55].

Une des mentions les plus anciennes décrivant l'Immortelle comme une plante médicinale remonte au II – III^{ème} siècle A.J.C. Dans son travail « *Historia Plantarum* », Theophrastus écrit que « *l'Heleiochrysos* » peut être utilisé dans le traitement de brûlures lorsque mélangé avec du miel et contre des piqûres ou morsures d'animaux vénéneux. Un autre exemple d'un rapport ancien est retrouvé dans le IV^{ème} volume de « *De Materia Medica* » écrit par le grec Pedanius Dioscorides. Ici, une décoction de fleurs d'Immortelle macérées dans du vin est décrite comme possédant des propriétés diurétiques et peut être utilisée dans le traitement de troubles urinaires, de morsures de serpents, de sciatique ou d'hernie [15].

Quant à la période de La Renaissance, la première archive écrite des utilisations des espèces d'*Helichrysum* en Afrique du Sud est attribuée au botaniste hollandais Herman Boerhaave qui a reporté leur utilisation dans le traitement de la nervosité et de l'hystérie en 1727 [32].

Dans les descriptions les plus anciennes d'*Helichrysum*, le genre est fréquemment décrit dans sa globalité, sans indication claire d'espèces spécifiques. Le fait est qu'*Helichrysum* est considéré comme un genre très complexe possédant de grandes similarités entre certaines espèces, ce qui peut justifier des difficultés historiques et populaires dans l'identification correcte des plantes.

Ces dernières décennies, plusieurs espèces ont été plus étudiées que les autres. Cet intérêt a été motivé par leurs applications thérapeutiques traditionnelles : les inflorescences d'*Helichrysum arenarium* utilisées en Europe Centrale se sont révélées être antiseptiques et spasmolytiques [55], alors qu'*Helichrysum graveolens* a des applications traditionnelles dans le contrôle des symptômes du diabète sucré, la cicatrisation et comme diurétique [56].

Helichrysum stoechas est très utilisé dans la médecine populaire espagnole pour ses propriétés cicatrisantes et anti-inflammatoires ainsi que ses utilisations pour les problèmes de la sphère urologique, le mal de dents et les désordres digestifs [15].

Helichrysum italicum elle, a été reportée comme étant utilisée à des fins anti-inflammatoires et antiallergiques tout comme des problèmes cutanés.

Les premières études scientifiques concernant *Helichrysum italicum* sont attribuées à Leonardo Santini. Ces études ont porté sur des patients présentant du psoriasis dans les années 1940 – 1950. Cependant, ses découvertes ont été publiées dans des journaux de très petite importance et ont largement été ignorées après sa mort [57] [58].

Ainsi, la recherche de mot-clé comme « *Helichrysum italicum* » ou « *H. italicum* » dans une base de données comme Pubmed révèle que la majorité du travail de recherche relatif à cette plante n'a été publiée qu'après les années 90.

Depuis quelques décennies, des études ethnopharmacologiques ont été menées dans différentes régions afin de rassembler le savoir des utilisations traditionnelles. Ces données montrent que les utilisations d'*Helichrysum italicum* les plus reportées sont celles traitant les problèmes respiratoires, digestifs et d'inflammation cutanée [15]. D'autres applications thérapeutiques incluent des applications antimicrobiennes et cicatrisantes. La validation scientifique de ces données s'appuie sur des études *in vitro* et *in vivo* [49] [22].

Une grande variété d'extraits d'Immortelle peut être préparée et les produits en résultant présentent des chémotypes différents (**tableau 3**).

Tableau 3 : composés chimiques principaux retrouvés dans les différents extraits d'*Helichrysum italicum* [15].

Taxa	Plant part	Extract	Main types of compounds
<i>Helichrysum italicum</i> subsp. <i>microphyllum</i> (Willd.) Nyman	Leaves and flowerheads	Acetone	Acetophenones, phloroglucinols, pyrones and sesquiterpenes
<i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don	Flowers	Diethyl ether	Flavonoids, terpenes, coumarins and steroids
<i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don	Flowers	Essential oil	Monoterpenes and sesquiterpenes
<i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don	Flowering tops	Ethanol	Flavonoids
<i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don	Aerial parts	Methanol	Flavonoids, acetophenones and triterpenes
<i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don	Flowers	Supercritical CO ₂	Sesquiterpenes and waxes

L'extrait d'*Helichrysum italicum* le plus analysé est l'huile essentielle obtenue à partir de toutes les parties vertes de la plante [59]. Ainsi, les études rapportant sa composition sont nombreuses [60] [47] [61] [62]. Il est important de souligner que la composition chimique de

l'huile essentielle d'Immortelle dépend de facteurs environnementaux et notamment la composition du sol [53].

3.4.2 Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est une réponse biologique complexe à des stimuli dangereux. Elle est requise pour éliminer l'agent offensif et pour initier le processus de guérison. Cependant, l'inflammation chronique peut mener à des pathologies comme l'arthrose rhumatoïde, l'athérosclérose et les désordres auto-immuns.

Les prostanoides et les leucotriènes (LTs), formés à partir de l'acide arachidonique (**figure 7**) (AA) via les voies de la cyclooxygénase (COX-1/2) et de la 5-lipoxygénase (5-LO), « arbitrent » les réponses inflammatoires, le remodelage chronique des tissus cancéreux, l'asthme et les maladies auto-immunes mais possèdent également des fonctions homéostatiques dans la tractus gastro-intestinal, l'utérus, le cerveau, le rein et les défenses.

L'utilisation clinique des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), molécules bloquant la formation de tous les prostanoides, est gênée par de sérieux effets secondaires notamment des lésions gastro-intestinales, des irritations rénales et des risques cardiovasculaires.

La recherche actuelle sur les anti-inflammatoires vise en l'identification de composés pouvant supprimer la formation massive de prostaglandine pro-inflammatoires (PG)E₂ sans affecter les synthèses homéostatiques de PGE₂ et PGI₂ et aussi inhiber la formation de LT.

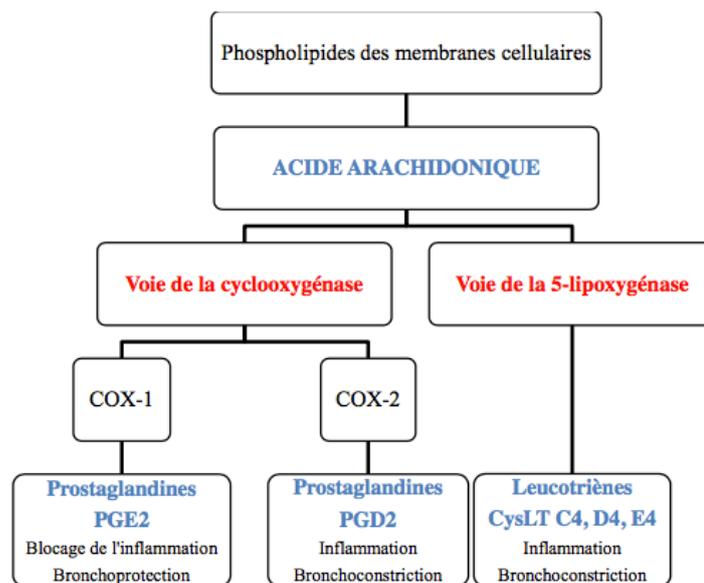


Figure 7 : métabolisme de l'acide arachidonique

Dans leurs études, Antunes et al. [15] ont étudié l'activité anti-inflammatoire d'*Helichrysum italicum*. Ils ont travaillé sur différentes fractions et classes de molécules isolées à partir d'Immortelle.

Les acétophénones isolées des fractions CH₂Cl₂, EtOAc et BuOH des extraits méthanoliques d'Immortelle ont été testés sur deux modèles *in vitro* différents pour étudier leur capacité à inhiber le métabolisme de l'acide arachidonique.

Dans le premier modèle, les acétophénones étaient capables de réduire la production de leucotriène B₄ alors que dans le deuxième modèle, l'activité de la cyclooxygénase-1 (COX-1) était inhibée.

Les flavonoïdes isolés de l'extrait méthanolique d'Immortelle sont également capables d'inhiber la production de leucotriène B. L'extrait à l'acétone quant à lui a joué un rôle dans l'inhibition de la production du facteur nucléaire kappa B.

Dans d'autres études, l'arzanol, un hétérodimère phloroglucinyl alpha-pyrone (**figure 8**), a été identifié comme l'anti-inflammatoire majeur d'*H. italicum*. [23] [57] [49] réduisant notamment l'activité du 5-LO d'une manière dose-dépendante (**figure 9**).

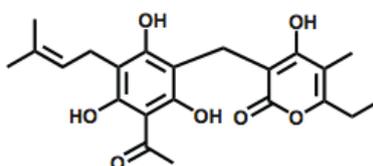


Figure 8 : arzanol [58]

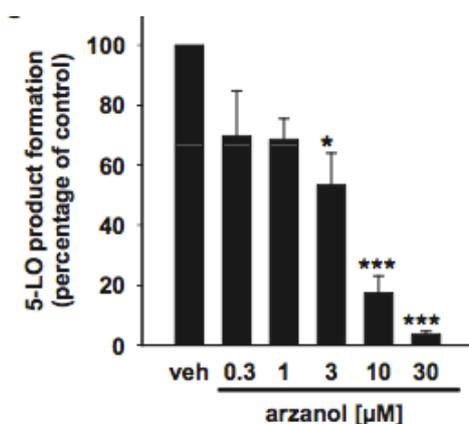


Figure 9 : inhibition de l'activité du 5-LO. Des cellules recombinantes humaines 5-LO ont été pré-incubées avec de l'arzanol ou un véhicule (veh, DMSO) et 1mM d'ATP pendant 10 minutes dans de la glace, pré-chauffées pendant 30 secondes à 37°C et la formation de 5-LO a commencé par l'addition de 2mM de CaCl₂ et de 20µM d' AA [58].

3.4.3 Activité antimicrobienne

Plusieurs extraits différents d'*Helichrysum italicum* ont montré un effet inhibiteur sur la croissance de bactérie Gram positif et/ou sur des facteurs de virulence.

Il a été démontré que l'huile essentielle et l'extrait au diéthyléther d'Immortelle ont la capacité d'inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus* de façon dépendante de la concentration, les souches résistantes à la méthicilline et les souches sensibles ne présentant pas de différence de sensibilité [49].

De plus, l'extrait éthanolique d'*Helichrysum italicum* peut inhiber la croissance de *Streptococcus mutans* et interfère avec ses effets cariogéniques [63].

Il est également intéressant de souligner que l'huile essentielle d'Immortelle et particulièrement un de ses constituants, le géraniol, joue un rôle important dans la capacité de restaurer les propriétés antibiotiques de plusieurs médicaments vis-à-vis de bactéries Gram négatives multi-résistantes. Le géraniol, en plus de restaurer l'activité du chloramphénicol contre *Enterobacter aerogenes*, augmente sa sensibilité à la pénicilline et l'ampicilline ainsi qu'à la fluoroquinolone et la norfloxacin.

Le géraniol de l'huile essentielle agit comme un inhibiteur des pompes à efflux ce qui est un mécanisme très important dans la mesure où la plupart des bactéries sont résistantes aux antibiotiques du fait de ce mécanisme de pompes [64].

Lorenzi & al. [27] ont montré que l'huile essentielle d'Immortelle augmente significativement l'efficacité du chloramphénicol contre les souches multi-résistantes d'*Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Ces résultats sont très prometteurs. En effet, l'augmentation des souches bactériennes multi-résistantes, et surtout les Gram négatives, posent problème à cause d'un manque d'alternatives efficaces aux antibiotiques conventionnels [65].

L'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* est aussi efficace contre *Candida albicans* [66], pathogène très important qui cause des affections allant des infections orales et génitales jusqu'aux infections systémiques fatales chez les patients immunodéprimés [67]. Cette activité

anti-candida de l'huile essentielle est attribuée à la fraction terpénoïde et ses composés oxygénés qui sont typiquement les plus actifs [68].

3.4.4 Activité anti-oedémateuse

Un œdème correspond au gonflement pathologique d'un organe ou d'un tissu dû à une accumulation ou un excès intracellulaire de liquide dans le milieu interstitiel. En condition physiologique, il existe un passage de liquide de la lumière capillaire vers l'interstitium qui est drainé par le système lymphatique. L'œdème résulte donc le plus souvent d'un déséquilibre entre les phénomènes qui tendent à déplacer le liquide des vaisseaux vers les espaces extravasculaires et les mécanismes qui tendent à en évacuer ce liquide, c'est-à-dire le drainage lymphatique interstitiel et l'absorption liquidienne par l'épithélium [69].

En plus de ses activités anti-inflammatoire et anti-microbienne, l'Immortelle possède aussi une activité anti-oedémateuse. En effet, Antunes et al. ont isolé les flavonoïdes de l'extrait méthanolique d'*Helichrysum italicum* et les ont injectés chez les souris au dosage de 80 mg/kg. Ces injections ont permis de réduire de plus de 50% l'œdème des pattes de souris 60 minutes après son induction par PLA₂.

Cependant, lorsque l'œdème est induit par une injection sous-cutanée de sérotonine, les flavonoïdes administrés de manière similaire à une dose de 50 mg/kg ont réduit la formation d'œdème de façon moindre (moins de 40%).

Contrairement aux études menées sur les animaux, il existe un manque sévère d'études cliniques menées chez les humains ce qui affaiblit la possibilité de confirmer les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* chez les animaux et ainsi empêche la validation des utilisations traditionnelles de cette plante.

Lorsque deux gouttes d'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* sont administrées oralement deux fois par jour pendant 10 jours et suivi d'une application topique de cette même huile essentielle diluée à 10% dans de l'huile végétale de *Rosa rubiginosa* pendant 2 à 3 mois sur les cicatrices post-opératoires de chirurgie plastique thoracique, une réduction de l'inflammation locale, d'œdème, de bleu et d'hématome a été observée [22].

3.4.5 Utilisation d'*Helichrysum* en dermatologie et en cosmétique

Les produits cosmétiques sont législativement définis par l'article L.5131-1 du code de la santé publique comme « toute substance ou mélange destiné à être mis en contact avec les parties superficielles du corps humain (épiderme, systèmes pileux et capillaire, ongles, lèvres et organes génitaux externes) ou avec les dents et les muqueuses buccales, en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles » [70].

A travers les temps, les gens ont développé et utilisé les produits cosmétiques : au Moyen – Age déjà les lèvres étaient teintées à l'aide d'une pommade colorée au carmin de cochenille et un teint de lait était obtenu grâce à la cèruse ; à la Renaissance, Louis XIV est un grand consommateur de cosmétiques : teint pâle, lèvres rouges, épaisse couche de fard ; aujourd'hui et plus que jamais, les cosmétiques font partie d'un rituel quotidien de milliards de personnes à travers le monde [71].

L'immortelle d'Italie est utilisée dans de nombreuses gammes de cosmétiques [19] [18].

En effet, toujours dans leur même étude portant sur *Helichrysum italicum*, Antunes et al. ont montré l'activité à visée dermatologique de l'Immortelle. Une solution alcoolique à 8% d'extrait brut de fleurs d'*Helichrysum italicum* et une solution alcoolique à 2% de la fraction flavonoïdes isolée de l'extrait brut ont été appliquées topiquement à des cochons d'Inde alors que seule la fraction de flavonoïdes a été appliquée à des humains 10 minutes avant une exposition aux UVB afin d'évaluer leurs activités photoprotective et anti-érythémateuse respectivement.

Les résultats ont montré que les deux, extrait brut et fraction de flavonoïdes, ont totalement prévenu l'apparition de réponse érythémateuse chez les cobayes. Lorsque testée chez les humains, la fraction flavonoïdes a assuré un facteur de protection solaire de 5 environ. Les études ont montré que les flavonoïdes étaient les composés actifs étant donné que leur fraction a réduit l'érythème induit par les UVB de la même manière que l'extrait total [31].

Le mécanisme proposé pour cette activité préventive est que la fraction contenant les flavonoïdes inhiberait la production locale de prostaglandines au niveau de la peau exposée et la libération d'histamine et l'activité des radicaux libres médiée par l'apigénine [72]. Cette fraction enrichie en flavonoïdes pourrait donc être utilisée pour la formulation de produits radioprotecteurs, traitant les brûlures et crèmes solaires.

L'Occitane, laboratoire spécialisé dans les cosmétiques a déposé un brevet, le brevet US 7,666,454 B2, relatif aux cosmétiques anti-rides contenant de l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* et plus particulièrement celle originaire de Corse ayant une teneur en acétate de néryle importante, de 40 à 50%, et conférant de nombreuses propriétés intéressantes (activités anti-radicalaire importante, d'augmentation de la synthèse de collagène I, d'augmentation de la production de VEGF (facteur angiogénique et mitogène pour les cellules endothéliales), de croissance des échanges cellulaires, d'activation de la microcirculation sanguine, effet décongestionnant et protecteur, antiseptique) [21]. Pour leur application en cosmétologie, L'Occitane a voulu mettre en évidence l'effet de l'huile essentielle d'Immortelle sur la production de collagène et l'angiogenèse.

Pour déposer ce brevet, les équipes ont mené différentes recherches. Tout d'abord, ils ont demandé à 20 volontaires d'appliquer une crème sur leur visage contenant 0,7% d'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* tous les matins pendant un mois sans utiliser un autre produit cosmétique pendant la durée de l'essai et 48h avant le début. Cette crème a eu pour effet de réduire la surface des rides de 37,8%, de diminuer le nombre de rides de 14% et la profondeur des rides de presque 20%.

Dans leur seconde expérience, les membres de l'équipe ont voulu évaluer *in vitro* l'influence de leur préparation faciale contenant 0,05% d'huile essentielle d'Immortelle sur la sécrétion de collagène par les fibroblastes. Ils ont donc incubé des fibroblastes avec leur préparation pendant 48h à 37°C et ont relevé une augmentation de la production de collagène de type I d'un facteur 6. Du fait du faible nombre de volontaires inclus dans l'essai, les résultats sont à prendre avec précaution.

Une autre étude a consisté en l'étude de l'effet d'une préparation destinée au visage contenant de l'huile essentielle d'Immortelle sur l'angiogenèse et le facteur VEGF.

In vitro, les modèles expérimentaux ont uniquement pris en compte de manière individuelle les différents éléments du processus d'angiogenèse en étudiant la prolifération des cellules endothéliales ou leur migration ou alors leur capacité à s'associer entre elles en formant des tubules lorsqu'elles sont en contact avec les protéines de la matrice extracellulaire. Les chercheurs ont testé plusieurs milieux : (1) un milieu contenant de la suramine qui est un agent inhibiteur de la formation des tubules, témoin négatif, (2) un milieu contenant du VEGF, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, témoin positif, (3) trois milieux contenant la préparation pour le visage qui est non miscible dans le milieu de

culture constitué de L-Glu et de sérum foetal de veau et donc diluée à 0,005 ; 0,01 et 0,05% dans l'éthanol et (4) un milieu contenant de l'éthanol qui est le témoin de solvant (**figure 10**).

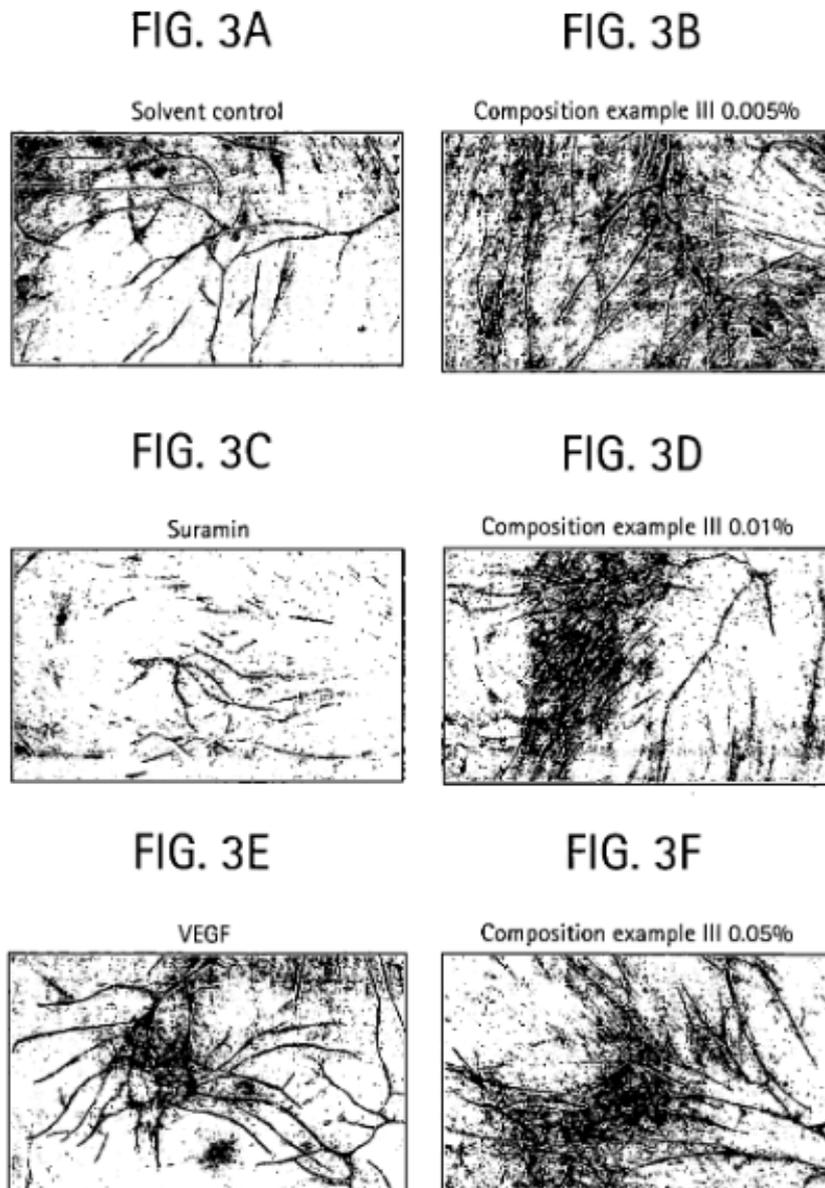
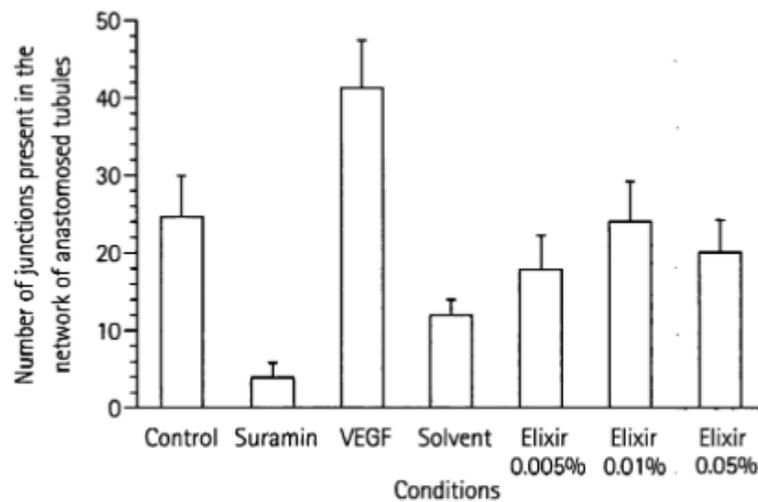


Figure 10 : résultats obtenus dans chaque milieu différent après 10 jours d'incubation. Fig. 3A : contrôle solvant ; Fig. 3B : milieu à 0,005% de préparation pour le visage ; Fig. 3C : milieu contenant de la suramine ; Fig. 3D : milieu à 0,01% de préparation pour le visage ; Fig. 3E : milieu contenant du VEGF ; Fig. 3F : milieu à 0,05% de préparation pour le visage [21].

Afin de suivre la formation de tubules, les six milieux différents ont été observés tous les jours. Grâce à l'analyse d'image, la longueur des tubes développés et les jonctions établies dans le réseau anastomosé ont permis la quantification des tubules.

L'analyse des résultats conclut à (1) une augmentation de la longueur des tubules de 6 à 11% avec la préparation faciale, et une augmentation de 54% dans le milieu contenant du

VEGF et (2) une augmentation du nombre d'anastomoses de 1,5 à 2% avec les préparations faciales et une augmentation de 1,5% dans le milieu contenant du VEGF (**figure 11**).



Conditions	Modulation factors of the number of junctions in relation to the control / solvent
Suramin	-5.7
VEGF	+1.7
Composition example III 0.005 %	+1.5
Composition example III 0.01 %	+2
Composition example III 0.05 %	+1.6

Figure 11 : résultats de l'analyse quantitative des anastomoses établies dans le réseau tubulaire [73].

Les variations de la longueur des tubules observées avec les préparations faciales à l'Immortelle ne sont pas significatives. Cependant, ces préparations ont induit un doublement de la stimulation du nombre d'anastomoses qui est comparable voire supérieur à l'effet du VEGF.

Les préparations à base d'Immortelle testées présentent bien un rôle de stimulation des paramètres essentiels à l'angiogenèse.

Les espèces *Helichrysum* retrouvées autour du pourtour méditerranéen représentent un groupe très polymorphe de plantes et sont des espèces difficiles à distinguer les unes des autres.

L'huile essentielle d'Immortelle est utilisée depuis des siècles pour ses nombreuses vertus, notamment cosmétiques. Cette huile essentielle peut présenter une grande variabilité chimique influencée par de nombreux paramètres comme l'origine géographique, le moment de la récolte, les paramètres physico-chimiques du sol, l'altitude, l'ensoleillement et la partie végétale utilisée pour l'extraction de l'huile essentielle.

Grâce à ses propriétés pharmacologiques, l'Immortelle d'Italie présente actuellement un intérêt économique : sa culture s'est beaucoup développée et notamment en Corse où elle sert de matière première à la production d'huile essentielle considérée comme rare.

Comme dans toutes les plantes retrouvées sur Terre, l'Immortelle d'Italie abrite de nombreux micro-organismes appelés endophytes. La partie qui suit est un état de l'art sur ce mode de vie endophytique, ses caractéristiques ainsi que de ces possibles applications.

PARTIE II : Micro-organismes endophytes

Les interactions entre les plantes et les autres organismes sont des interactions très complexes parfois difficilement comprises et décrites.

Aujourd'hui, afin de mieux appréhender ces relations, le microbiome associé aux plantes, défini comme étant la communauté de micro-organismes vivant en étroite relation avec ces plantes [74], est soumis à une importante investigation de manière à améliorer la compréhension de ses effets sur le développement des plantes, leur santé et leur résistance aux parasites. Ces découvertes d'interactions bénéfiques pourraient potentiellement être appliquées à l'agriculture par exemple et dans de nombreux autres domaines industriels.

Dans la Nature, de nombreuses interactions entre les différents organismes existent. De telles interactions impliquent deux parties : l'hôte et le symbiote. L'organisme hôte pourrait alors être défini comme étant le fournisseur de ressources et le symbiote comme le consommateur de ces ressources conférant à son hôte des services en retour ou non. Cette définition rejoint celle de Ferrière et al. qui considère l'hôte comme producteur de commodités et le symbiote comme partenaire conférant des produits et services [75].

Les coûts et bénéfices des relations plantes-microorganismes, qu'elles soient néfastes pour l'une des deux parties, c'est-à-dire parasitiques ou bénéfiques pour les deux parties, c'est-à-dire mutualistes, ne sont pas toujours clairs et peuvent fluctuer selon un continuum qui peut être influencé par des facteurs environnementaux, le temps et la biologie des parties impliquées.

En général, dans les livres d'écologie et de biologie, les relations symbiotiques sont divisées en différentes catégories en fonction des bénéfices apportés ou non. Dans le cas où hôte et symbiote bénéficient réciproquement de la relation, l'association est considérée comme mutualiste ou endophytique (1) alors que si le symbiote utilise l'hôte sans conséquences dommageables ou bénéfiques pour ce dernier alors la relation est considérée comme commensale (2). Au contraire, si le symbiote utilise l'hôte comme une ressource à ses dépens alors l'interaction est définie comme parasitique (3).

Pourtant en pratique, une telle classification reflète rarement la véritable dynamique des relations retrouvées dans la Nature. En effet, les interactions entre les différents

organismes existent suivant une gradation continue et les frontières entre mutualisme, commensalisme et parasitisme ne sont pas aussi bien délimitées que ce que leurs définitions peuvent suggérer [75].

1. Histoire des définitions d'endophytes

Le botaniste allemand Heinrich Friedrich Link fut le 1^{er} à décrire les endophytes en 1809. A l'époque, ils étaient appelés « *Entophytae* » et décrits comme un groupe distinct de parasites fongiques partiels vivant dans les plantes [76]. Depuis, de nombreuses définitions en ont découlé. Pendant longtemps, ils ont été considérés comme pathogènes ou parasites. Cependant, Béchamp les a surnommés « *mycrozymas* » en faisant référence aux micro-organismes.

Globalement, au XIX^{ème} siècle, la croyance était que les plantes normales et en bonne santé étaient stériles et ainsi libres de tout micro-organisme. En effet, il y a 125 ans, le microbiologiste français Galippe s'est heurté à la critique de scientifiques de renom tels Louis Pasteur, Charles Chamberland ou Auguste Fernbach, qui eux avaient démontré que les plantes étaient normalement exemptes de quelconque colonisation contrairement à lui qui avait proposé que les plantes abritaient des micro-organismes dans leurs tissus issus de la rhizosphère [77].

D'autres études menées par Laurent E. à la fin du XIX^{ème} et au début du XX^{ème} siècle ont confirmé la présence de micro-organismes bénéfiques vivant à l'intérieur des végétaux. De nos jours, il est bien établi que les plantes hébergent de nombreux types d'endophytes comme notamment des bactéries, des champignons et des eucaryotes unicellulaires (algues) [78].

En 1888, le microbiologiste allemand Martinus Willem Beijerinck a fait une découverte importante : il a isolé d'une légumineuse de la famille des Fabacées des bactéries de nodule racinaire et a montré que ces isolats étaient capables de fixer l'azote atmosphérique. Au même moment, Albert Bernhard Frank a reporté une importante symbiose mutualiste : le vivre-ensemble d'organismes différents [79] entre les racines d'arbres et des champignons terricoles. Il a inventé le terme « *mycorhize* » afin de décrire cette interaction, littéralement signifiant « les champignons des racines ».

Plus récemment, en 1991, Orlando Petrini a défini les endophytes comme étant « tous les organismes vivant dans une plante et qui à un certain moment de leur cycle peuvent coloniser les tissus végétaux internes sans causer de dommages apparents néfastes à leurs hôtes » [80]. Depuis lors, de nombreuses définitions ont été formulées. Ces nouvelles définitions partagent toutes le fait que pour ces micro-organismes, tout leur cycle ou seulement une partie, se fait en colonisant les tissus de plantes vivantes sans causer de tort à leurs hôtes.

Bien que cette définition ait été la base de beaucoup d'études et soit une approche pragmatique pour distinguer les pathogènes des endophytes, elle présente quelques inconvénients et soulève des questions. En effet, cette définition est plus appropriée aux endophytes cultivés, et seulement s'il est possible d'évaluer la pathogénicité. Toutefois, dans la plupart des cas, ces essais ne sont pas réalisés ou alors seulement avec une seule espèce de plante bien que la pathogénicité puisse apparaître avec différents génotypes végétaux ou sous différentes conditions.

Deuxièmement, des endophytes peuvent vivre sous une forme de pathogènes latents à l'intérieur des plantes et devenir pathogènes sous des conditions spécifiques.

Enfin, il a été montré que certains endophytes appartiennent à des espèces pathogènes bien connues d'une plante hôte spécifique mais avec des effets promoteurs de croissance sur d'autres espèces [81].

2. Endophytisme

L'endophytisme est un mode de vie qui peut être adopté par certains micro-organismes, bactéries ou plus communément champignons, et qui se caractérise par la colonisation des structures internes de la plante de manière asymptomatique.

Contrairement aux endophytes, les épiphytes vivent sur les surfaces végétales externes au-dessus du niveau du sol, la phyllosphère. Les épiphytes peuvent être nettoyés et enlevés de ces surfaces, ou inactivés, par désinfection en utilisant communément de l'hypochlorite de sodium et de l'éthanol [82].

Il est parfois retrouvé dans la littérature que l'endophytisme donne inéluctablement lieu à une interaction biologique mutuellement positive, ou à défaut, au moins non délétère pour la plante hôte, auquel cas cette relation pourrait être qualifiée de mutualiste [83].

Pourtant, l'endophytisme n'est pas une relation systématiquement durable et peut devenir délétère pour la plante si les colonisateurs se développent de manière intempestive. D'autre part, un endophyte peut être bénéfique pour une espèce végétale et pathogène pour une autre.

Des investigations ont mené à l'émission d'une hypothèse selon laquelle l'interaction endophyte – hôte serait un antagonisme pathogène – hôte équilibré [84].

D'après l'hypothèse de Schulz et al. en 1999, d'« antagonisme équilibré » (**figure 12**), les endophytes réussiraient à éviter à ce que la plante n'active ses défenses à leur égard, à assurer leur propre défense avant d'être neutralisés par les métabolites toxiques de leurs hôtes et à se développer à l'intérieur des plantes sans leur causer de maladies. Ainsi, si la virulence fongique et les défenses de la plante sont équilibrées, l'association des deux organismes semble être asymptomatique et non dommageable.

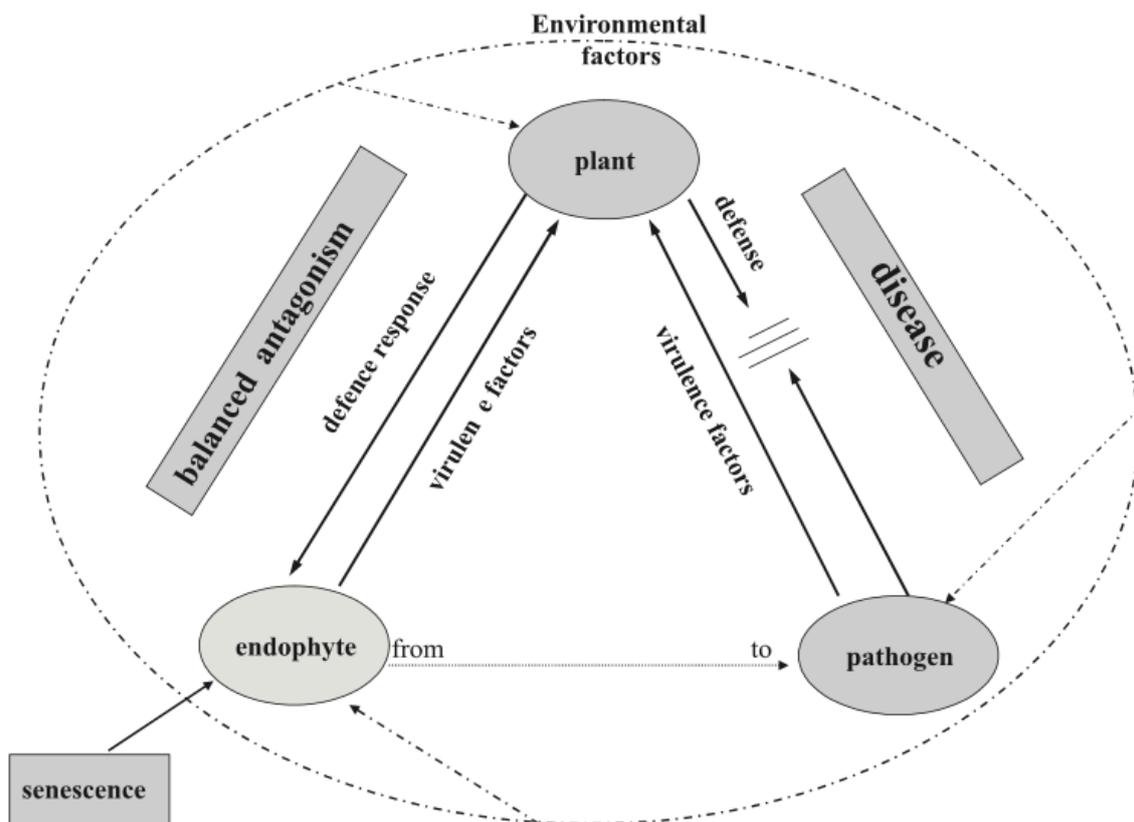


Figure 12 : hypothèse : antagonisme équilibré entre la virulence endophytique et la réponse défensive végétale entraînant une colonisation asymptomatique [85].

Lorsque l'équilibre est respecté, les interactions endophytes – hôtes assurent des bénéfices aux deux partenaires, plante et micro-organismes. En effet, pour les hôtes, les

endophytes peuvent (1) améliorer l'assimilation des nutriments nécessaires à la croissance et à la survie de la plante, (2) promouvoir la croissance de la plante par synthèse de phytohormones, améliorer la tolérance au stress biotique et abiotique, (3) inhiber l'infection de la plante par des pathogènes et (4) augmenter la biomasse végétale. Les endophytes quant à eux trouvent en leurs hôtes un environnement familier leur assurant une protection et un développement certains [86].

Les associations symbiotiques doivent donc être très nuancées et peuvent facilement basculer d'une relation néfaste pour une des deux parties à une relation bénéfique, ou du moins non délétère, pour les deux parties en réponse à un changement environnemental même minime et vice versa [87].

Les endophytes constituent une classe très large de microorganismes (bactéries et champignons) capables de biosynthétiser des métabolites secondaires. Dans la suite de ce travail, seulement les endophytes fongiques seront abordés.

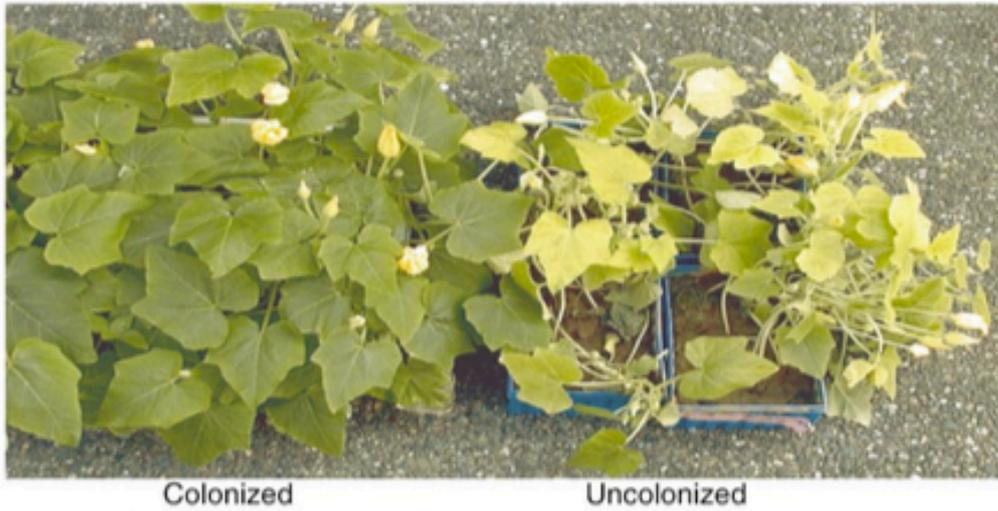
Plus de 100 ans de recherches suggèrent que pratiquement toutes, si ce n'est toutes, les plantes d'un écosystème naturel sont en symbiose avec des endophytes fongiques, endophytes les plus communément retrouvés.

Les pathogènes et les endophytes fongiques méritent une attention plus particulière parmi les champignons présents dans les plantes car ils peuvent être des sources prometteuses de biocatalyseurs présentant de nombreuses applications.

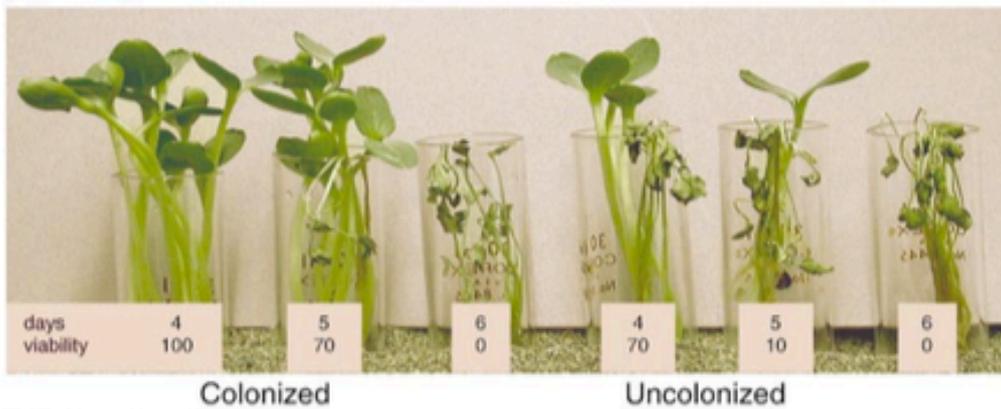
La distinction entre pathogénicité et endophytisme pourrait être déterminée par un unique gène comme l'ont montré Freeman & al. en 1993 et Redman & al. en 1999 [88].

Ce groupe très diversifié de micro-organismes peut profondément impacter les communautés végétales en améliorant la tolérance des hôtes aux stress biotique et abiotique en augmentant la biomasse végétale, en diminuant la consommation d'eau notamment (**figure 13**). Pourtant, malgré toutes ces recherches et des milliers de publications scientifiques, l'importance écologique de ces champignons reste très peu caractérisée [89].

(a) Disease resistance



(b) Drought tolerance



(c) Growth enhancement

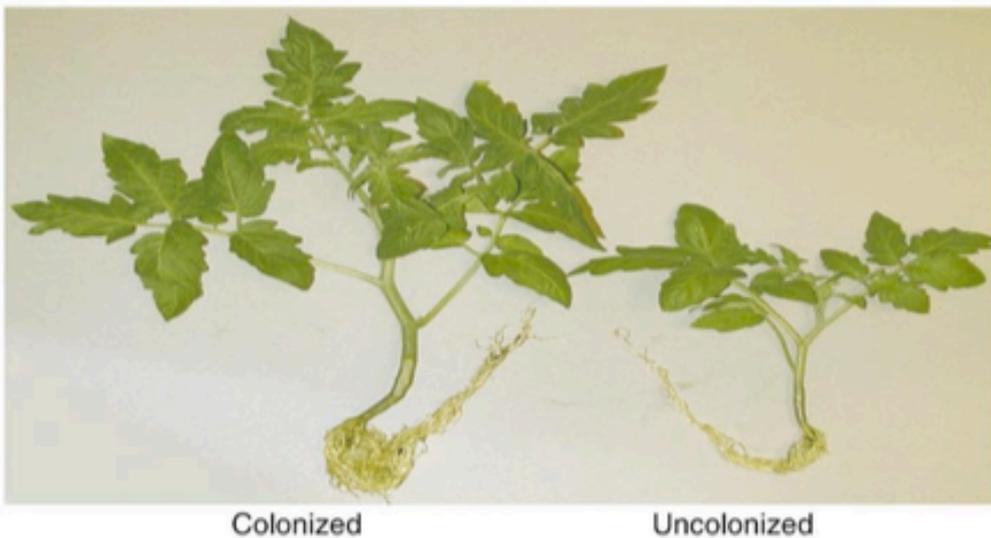


Figure 13 : différences de (a) résistance à la maladie due au pathogène *Phytophthora capsici*, (b) tolérance à la sécheresse des pousses de pastèque et (c) amélioration de la croissance des plants de tomates entre les plantes colonisées par les endophytes et les plantes contrôles, donc non colonisées [90].

2.1 Modes de transmission

Ces endophytes fongiques, endophytes les plus couramment retrouvés [91], représentent une très grande diversité et sont principalement issus du phylum Ascomycète [92].

Deux modes de transmission différents, vertical et horizontal, sont observés chez les endophytes fongiques (**figure 14**). Le mode de transmission est le moyen par lequel le champignon endophyte peut coloniser un autre individu végétal à partir de l'hôte initial.

Ces modes de transmissions peuvent dépendre des conditions environnementales [93]. Par exemple, l'humidité peut être un facteur critique pour une infection réussie par des spores pour une transmission horizontale [94] alors qu'une transmission verticale par des graines « infectées » dépendra de la bonne hydratation du sol [95]. Ou encore, le transfert horizontal des hôtes sains est plus commun lorsque les plantes poussent à l'ombre [96].

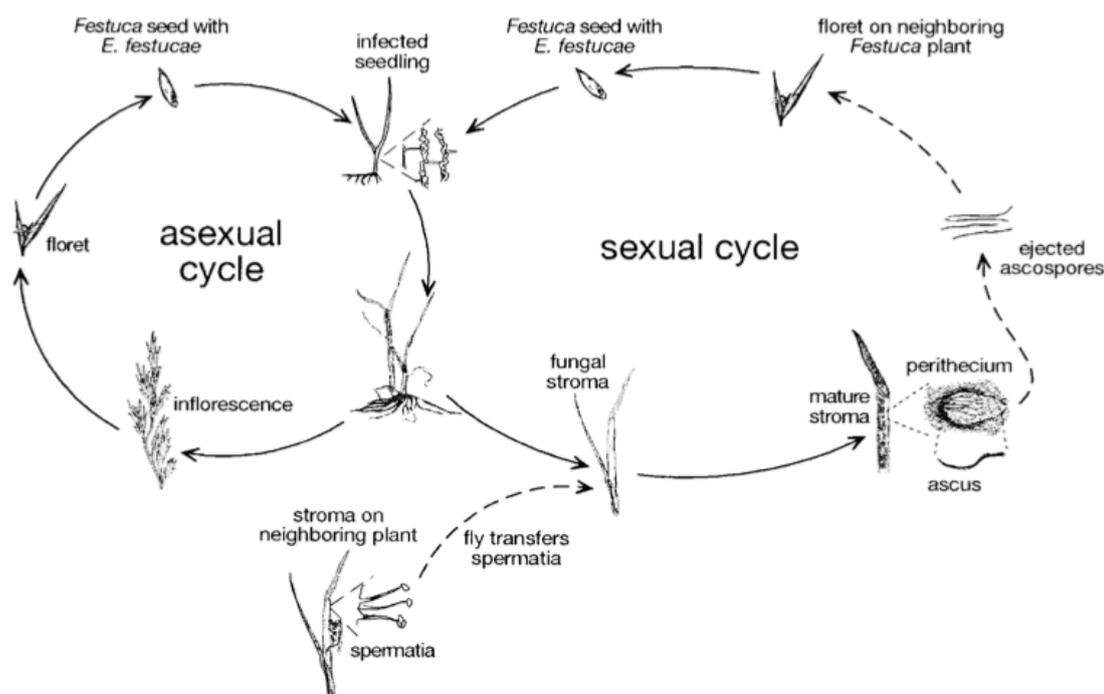


Figure 14 : modes de transmission observés chez les endophytes fongiques : exemple du cycle d'*Epichloë festucae* [97]. L'endophyte *Epichloë festucae* colonise la fétuque élevée (*Festuca arundinacea*). Ici, le cycle asexué correspond à une transmission verticale : le mycélium du champignon endophyte présent dans la plante pénètre dans la graine portée par la plante. La graine est disséminée, germe et forme un nouvel individu végétal qui est la descendance de l'hôte primaire et qui est à son tour colonisé par le champignon.

Le cycle sexué quant à lui correspond à une transmission horizontale : l'endophyte fongique présent dans l'hôte, après plasmogamie et caryogamie, forme un stroma sur lequel se développent les organes de reproduction sexuée. Les ascospores sont dispersées et permettent la colonisation de l'inflorescence d'une plante voisine. Le mycélium passe dans la graine nouvellement formée qui va à son tour être disséminée et germer.

2.1.1 Transmission verticale

Tout d'abord, la transmission verticale de gènes se produit lorsque l'organisme reçoit du matériel génétique provenant de son ancêtre. Elle se caractérise par la colonisation d'un nouvel hôte descendant de l'hôte primaire lui-même déjà infecté.

Un hyphe d'un endophyte fongique pénètre alors dans une graine de pollen ou dans une propagule de la plante hôte [98]. Elle permet ainsi la contamination de la descendance de l'hôte primaire et l'endophyte fongique reste donc génétiquement identique (dissémination par reproduction asexuée) mais il peut s'implanter soit dans un clone, par colonisation d'une propagule, soit dans un hôte génétiquement différent issu d'une nouvelle génération par colonisation d'un grain de pollen ou d'une graine.

Contrairement au transfert horizontal de gènes, le transfert vertical est indépendant à la fois, de la densité de l'hôte et de la prévalence de l'infection. Cette dernière n'est donc pas affectée lorsque les populations hôtes sont peu nombreuses et la fréquence de l'infection faible [99]. Ce mode de transmission semble être le plus important quand la fréquence des infections est élevée, et ce car il y a peu d'individus sains à coloniser par transfert horizontal.

La transfert vertical par la graine a principalement été observée chez des endophytes fongiques de la famille des Clavicipitacées colonisant les Poacées, les Cypéracées et les Juncacées mais également chez plusieurs espèces graminoides telles *Pinus* spp., *Vigna unguiculata*, *Theobroma cacao*, *Castanea* spp., *Colophospermum mopane*. Une telle transmission n'a pas été observée avec les endophytes fongiques ubiquitaires comme ceux appartenant aux genres *Alternaria* et *Cladosporium* [93].

2.1.2 Transfert horizontal

Le transfert horizontal de gènes quant à lui, également appelé transfert latéral, est un processus dans lequel un organisme intègre du matériel génétique provenant d'un autre organisme sans en être le descendant. Elle se fait via des spores qui peuvent être disséminées par le vent, des éclaboussures d'eau ou par un vecteur, en général des insectes.

Ce transfert se caractérise donc par la colonisation d'un nouvel hôte n'ayant, le plus souvent, pas de lien avec l'hôte initial. Après germination, l'hyphe pénètre dans son nouvel hôte soit par les stomates (orifice de petite taille présent dans l'épiderme des organes aériens végétaux permettant des échanges gazeux entre la plante et l'air ambiant) ou alors par

pénétration directe au travers de l'épiderme. Les spores peuvent être issues de la reproduction sexuée ou asexuée du champignon.

2.2 Classifications des endophytes fongiques

D'après Rodriguez et al., deux groupes majeurs d'endophytes fongiques ont été historiquement décrits reflétant les différences de filiation évolutive, de taxonomie, de plantes hôtes et de fonctions écologiques (**tableau 4**). Le premier groupe est celui des endophytes issus de la famille des Clavicipitacées (C – endophytes), qui infectent les graminées ; le second est celui des endophytes non issus de la famille des Clavicipitacées (NC – endophytes), qui peuvent être isolés à partir de tissus asymptomatiques de plantes non vasculaires, de fougères et apparentés, de conifères et d'angiospermes [100].

Dans la littérature, une classification des endophytes existe bien mais elle reste compliquée et non encore assez précisément documentée.

Tableau 4 : critères symbiotiques utilisés pour caractériser les différentes classes d'endophytes fongiques

Critères	Clavicipitacées		Non Clavicipitacées	
	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Gamme d'hôtes	Étroite	Large	Large	Large
Tissu(s) colonisé(s)	Rameau et rhizome	Rameau, rhizome et racines	Rameau	Racines
Colonisation <i>in planta</i>	Étendue	Étendue	Limitée	Étendue
Biodiversité <i>in planta</i>	Faible	Faible	Importante	Inconnue
Transmission	Verticale et horizontale	Verticale et horizontale	Horizontale	Horizontale
Avantages pour la santé végétale*	NHA	NHA et HA	NHA	NHA

* Bénéfices non adaptés à l'habitat (NHA) comme la tolérance à la sécheresse et l'amélioration de la croissance sont communs des endophytes indépendamment de l'habitat d'origine. Les bénéfices adaptés à l'habitat (HA) résultent de la spécificité de l'habitat comme le pH, la température et la salinité.

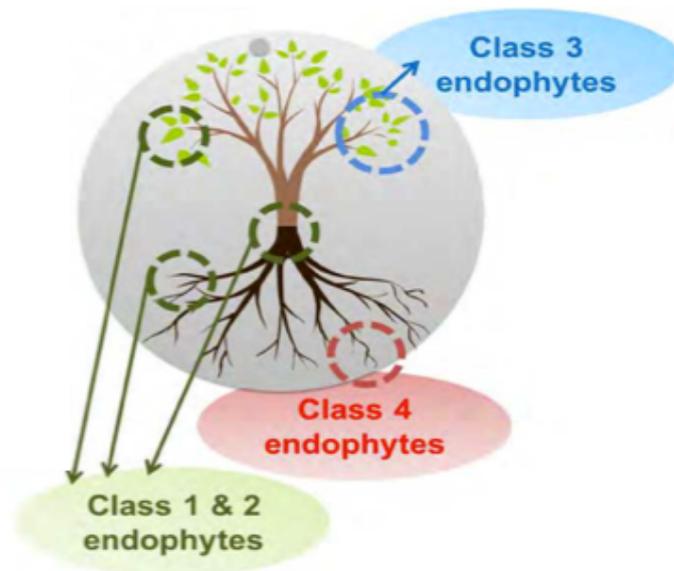


Figure 15 : classes d'endophytes en fonction des tissus colonisés [34]

Comme indiqué dans le **tableau 4**, les NC – endophytes représentent un ensemble très diversifié de champignons divisé en trois groupes fonctionnels basés sur un éventail de caractéristiques : les tendances de colonisation des endophytes, les mécanismes de transmission entre les générations d'hôtes, les niveaux de biodiversités *in planta* et les fonctions écologiques. Contrastant avec cette diversité, les C – endophytes constituent la classe 1.

2.2.1. C – endophytes

- **Endophytes de classe 1**

La classe 1 des endophytes est une famille de champignons (ordre Hypocréales ; division Ascomycètes) incluant des espèces libres et des espèces symbiotiques associées à des insectes, des graminées, des herbes pérennes ou des carex.

Les espèces fongiques de cette famille sont considérées comme endophytes du fait qu'ils sont des symbiotes systémiques persistant tout au long de la vie de ses plantes hôtes, et, s'ils sont transmis de façon verticale, ils restent indéfiniment dans les lignées hôtes [101].

Des reconstitutions d'états ancestraux de structures phylogénétiques multilocus suggèrent que les C – endophytes proviendraient d'ancêtres insectes – parasites qui se seraient diversifiés au travers d'une série de sauts d'hôtes appartenant à différents règnes [102] [103].

Par exemple, l'évolution d'*Epichloë neotyphodium* et *Balansia* serait le fruit d'un insecte parasite qui aurait progressé vers la plante épibiotique sous forme biotrophique. Il

aurait ainsi eu accès aux nutriments de la plante en infectant et en tuant d'abord les cochenilles et les mouches blanches puis se serait développé grâce aux nutriments émergeant à la surface de la plante par les lésions causées par les insectes. Ce scénario met en avant un raccourci vers la biotrophie (caractéristique des champignons et parasites qui se nourrissent de cellules sans les détruire) qui n'inclut pas la transition, souvent décrite, de pathogènes virulents de la plante à l'endophytisme.

Les études portant sur l'utilisation des ressources nutritives montrent que l'évolution de la biotrophie et l'endophytisme dans cette classe implique (1) la réduction des capacités enzymatiques, (2) l'augmentation de la dépendance à l'hôte végétal pour fournir les nutriments nécessaires à leur croissance et (3) une augmentation apparente de la production de métabolites secondaires particuliers bénéfiques à la symbiose [104].

L'origine des C – endophytes à partir des insectes pathogènes pourraient en partie expliquer leur capacité à produire des toxines infectant les insectes et les autres animaux : l'arsenal chimique utilisé par les taxons vivant librement comme *Cordyceps* qui dégrade et tue efficacement les insectes, est similaire ou partage des précurseurs majeurs avec ceux utilisés par les endophytes retrouvés dans les graminées.

Ces endophytes représentent un petit nombre d'espèces de Clavicipitacées phylogénétiquement reliées, difficilement cultivables en laboratoire et retrouvées de manière assez limitée dans les graminées de mi – saison. Ces endophytes se retrouvent dans de jeunes pousses végétales où ils forment des infections intercellulaires systémiques.

Les endophytes de cette classe augmentent fréquemment (1) la biomasse végétale, (2) confèrent une meilleure tolérance à la sécheresse et produisent des composés chimiques, les alcaloïdes, toxiques pour les animaux et les insectes diminuant ainsi le pâturage et le broutage [105].

Pourtant, ces bénéfices accordés par ces colonisateurs semblent dépendre de l'espèce hôte, de son génotype et des conditions environnementales : les nutriments disponibles dans le sol peuvent limiter la capacité du champignon endophyte à produire des alcaloïdes dérivés d'azote et ainsi altérer la qualité de la plante pour les herbivores [106]. Tout comme les facteurs environnementaux – nutriments présents dans le sol et humidité – peuvent changer de manière spatio-temporelle, les interactions endophytes – plantes dans des communautés naturelles peuvent aussi bien varier de manière similaire [107].

La plupart des C – endophytes comme les espèces *Epichloë/Neotyphodium* améliorent la résistance des hôtes vis-à-vis des insectes suceurs [108]. Tintjer et Rudgers en 2006 [93] ont trouvé que la dissuasion des insectes herbivores dépendait de la souche fongique et du niveau de croissance de la plante. Une autre étude a montré que la péramine, métabolite fongique, protège les plantes des herbivores [109]. Cette protection contre les insectes herbivores assurerait une forte pression de sélection pour le maintien des gènes fongiques biosynthétiques.

Cependant, la recherche a également montré que certains de ces endophytes n'apportent pas aux plantes hôtes la résistance aux insectes et nématodes [106] [107] et a mis en évidence l'importance d'examiner les plantes dans leurs conditions et habitats naturels afin de déterminer les bénéfices réels conférés par les endophytes.

2.2.2. NC – endophytes

Contrairement aux endophytes de classe 1, les NC – endophytes, sont très diversifiés et représentent un assemblage phylogénétique essentiellement constitués de champignons ascomycètes avec différents rôles écologiques souvent mal connus et définis.

Les endophytes de cette classe ont été retrouvés et isolés à partir de tous les écosystèmes terrestres possibles et de toutes les lignées de plantes possibles, incluant les agrosystèmes et biomes des tropiques à la toundra [82]. L'échelle de leur diversité, de leurs rôles écologiques, les connaissances qu'ils apportent sur l'évolution des modes écologiques des champignons, leurs applications potentielles et la capacité de nombreux champignons de voyager entre vie symbiotique et solitaire [110] deviennent plus évidents et engendrent un enthousiasme grandissant chez les mycologues, les écologistes, les physiologistes et les scientifiques appliqués.

Comme abordés précédemment, Les NC – endophytes peuvent être divisés en trois groupes fonctionnels en se basant sur différentes caractéristiques (**tableau 4**).

- **Endophytes de classe 2**

Les endophytes de cette classe comprennent une grande diversité d'espèces, toutes appartenant au sous règne Dikarya (Ascomycètes majoritairement ou Basidiomycètes minoritairement).

Ces micro-organismes fongiques peuvent exister aussi bien dans les tissus aériens de la plante que dans ses tissus enterrés contrairement aux endophytes des deux classes suivantes. Comme le **tableau 4** l'indique, (1) ils sont capables d'infecter largement la plante, (2) sont transmis par les téguments des graines et/ou les rhizomes, (3) ont une faible abondance dans la rhizosphère, (4) confèrent des bénéfices adaptés à l'habitat en plus des bénéfices indépendants et enfin, (5) ils présentent de hautes fréquences d'infection (90 – 100%) chez les plantes poussant dans des conditions de stress.

Ces endophytes sont nécessaires pour le développement normal de certaines plantes en augmentant la croissance racinaire et la biomasse des pousses [111] et en conférant également une plus grande tolérance à des stress biotiques et abiotiques comme les maladies, la sécheresse, la dessiccation, la chaleur et la salinité [90] [112].

Malheureusement, ces mécanismes sont peu caractérisés. Quelques études ont indiqué que des processus biochimiques correspondent à la tolérance au stress conférée par la symbiose. Par exemple, lorsqu'exposées à des pathogènes virulents, les plantes colonisées par les endophytes activent leurs défenses plus rapidement que si elles étaient dépourvues d'endophytes [113]. En absence d'exposition aux pathogènes, les plantes colonisées par des endophytes de classe 2 n'activent pas leur défense.

- **Endophytes de classe 3**

Les endophytes de classe 3 sont distingués de leurs homologues grâce à deux critères principaux : premièrement, ils sont localisés au niveau de la rhizosphère et deuxièmement, ils sont transmis de manière horizontale via des spores et des fragments d'hyphe d'une plante à l'autre par le biais d'agents de dispersion biotiques ou abiotiques.

De plus, les endophytes de cette classe ont le potentiel de conférer des bénéfices à l'hôte pas forcément spécifiques de l'habitat et très notables pour leur grande diversité dans les tissus hôtes, les plantes et les populations.

Les coûts et bénéfices engendrés par les endophytes de classe 3 ont été évalués expérimentalement un très rare nombre de fois et en dehors de leur contexte environnemental.

Mais ces expériences sont trop peu significatives comparées à la diversité des micro-organismes.

Ainsi, les travaux prenant en compte la complexité de ces communautés d'endophytes sont nécessaires dans les années à venir et réserveront sans doute de nombreuses surprises.

- **Endophytes de classe 4**

Les endophytes de classe 4 présentent un spectre d'hôte large (**tableau 4**) bien qu'on les trouve souvent associés à des arbres et arbustes, en particulier des conifères. Ils colonisent de façon extensive et exclusive les racines de la plante.

En plus des critères de distinction listés dans le **tableau 4**, ils sont également caractérisés par la présence de septums foncés du fait de la mélanine : « dark septate endophytes », DES.

Ils ont une faible spécificité d'hôtes et d'habitat : ils ont été isolés et étudiés à partir de 600 plantes incluant des plantes non mycorrhiziques, d'Antarctique, d'Arctique, alpines, subalpines, de zones tempérées comme de côtes et plaines africaines et d'écosystèmes tropicaux [114].

En somme, ces DES sont retrouvés à travers le monde de façon ubiquitaire et sont d'autant plus présents dans des environnements de haut stress abiotique.

Ils semblent représenter une large et intéressante classe d'endophytes, mais ils n'ont pas encore été précisément définis taxonomiquement et écologiquement. Tout comme les endophytes de la classe précédente, ceux-ci devront être étudiés sur des plans biologiques, écologiques et physiologiques.

2.3 Endophytes fongiques : source de composés bioactifs

Les endophytes fongiques sont à l'origine d'une immense diversité de molécules chimiques. Cette diversité regroupe de nombreux produits naturels encore non définis chimiquement et présumés repousser les frontières de la découverte de nouveaux médicaments. Par exemple, parallèlement aux activités antinéoplasiques cliniques reconnues du paclitaxel, les recherches sur les endophytes ont mené à la découverte de potentielles drogues utilisables en thérapeutique, directement ou indirectement, avec des propriétés antibactériennes, antivirales, anti-oxydantes, mimant l'insuline, anti-neurodégénératives et immunosuppressives [91].

2.3.1. Biosourcing des endophytes

La bioprospection d'endophytes a soulevé d'excitantes possibilités d'exploration et d'utilisation de leur potentiel dans différents domaines notamment médical et agricole. Différentes stratégies de bioprospection peuvent être employées afin de découvrir des endophytes aux caractéristiques attrayantes (**figure 16**) [34].

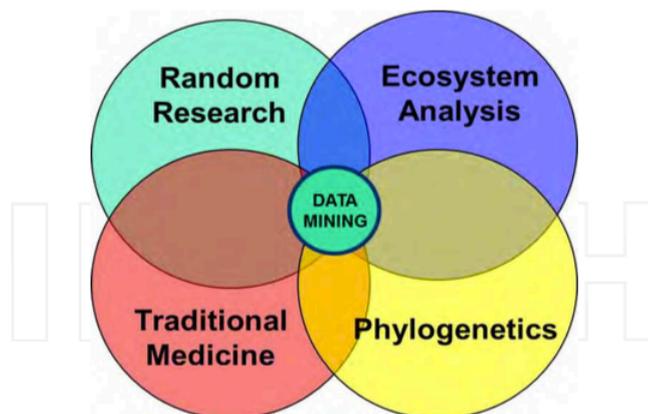


Figure 16 : les différentes stratégies utilisées en bioprospection afin de découvrir des endophytes nouveaux ou compétents avec des caractéristiques désirables [34].

Les premiers travaux traitant de la biosynthèse par les endophytes de composés initialement produits par la plante hôte ont été publiés par Stierle et al. en 1993 [115]. Ces travaux ont suivi la découverte très acclamée de l'endophyte *Taxomyces andreanae*, initialement isolé à partir d'If du Pacifique *Taxus brevifolia*, et capable de produire le paclitaxel (Taxol®) un composé anticancéreux indiqué dans les cancers de l'ovaire, du sein, bronchique.

Inspirés de cette découverte, beaucoup d'efforts ont été faits afin d'identifier des endophytes comme sources de produits naturels initialement décrits chez les plantes. Les endophytes produisant l'antineoplasique camptothécine et ses analogues, les prodrogues anticancéreuses podophyllotoxine et déoxyphyllostoxine, les antidépresseurs hypéricine et émodine ou encore les insecticides naturels comme l'azadirachtine A et B, la pipérine sont quelques-unes des découvertes intéressantes qui ont suivi.

Afin de cibler et maximiser les meilleures opportunités d'isolement des endophytes fongiques capables de produire des métabolites secondaires d'intérêt, une approche rationnelle de sélection doit être réfléchi de façon ingénieuse.

Tout d'abord, les plantes issues d'une niche écologique particulière, comme par exemple les forêts tropicales et subtropicales [116], écologiquement inimitable et

particulièrement celles avec des morphologies peu communes et possédant des stratégies de survie originale, pourraient regorger d'endophytes non encore décrits.

De plus, les plantes avec un historique ethnobotanique et associées à des pratiques spécifiques ou des applications intéressantes doivent aussi être étudiées afin d'en déceler des endophytes compétents.

Enfin, il existe une dernière approche qui consiste à étudier les plantes poussant dans des zones de biodiversité importantes. Ces plantes jouent un rôle essentiel dans la génération de produits naturels bioactifs et abritent diverses populations endophytiques.

En Inde, une plante de la médecine ayurvédique, *Azadirachta indica*, plus communément appelée le neem indien est utilisée depuis des millénaires notamment pour le traitement de la fièvre, de la douleur ou encore de la lèpre. Son utilisation la plus courante est due à ses propriétés insectifuges [118] dont l'azadirachtine et ses analogues sont à l'origine. D'ailleurs, récemment, un endophyte fongique, *Eupenicillium parvum*, issu du neem indien a été isolé et a montré des capacités de synthèse d'azadirachtine A et B dans des conditions de cultures axéniques [119].

2.3.2. Familles de composés naturels produits par les endophytes

Les composés naturels synthétisés par les endophytes sont nombreux parmi eux, les métabolites secondaires sont les plus intéressants car ils présentent une activité plus importante. Ces métabolites sont généralement définis comme étant des molécules de bas poids moléculaire, indirectement impliqués dans le développement ou la reproduction de l'organisme, par opposition aux métabolites primaires qui eux interviennent dans le fonctionnement vital de l'organisme. Si certaines de ces molécules peuvent avoir des applications thérapeutiques pour l'homme ou encore des applications en agriculture, le rôle de ces métabolites spécialisés chez l'endophyte fongique est très diversifié. En effet, des toxines autant que des phytohormones pourront être retrouvées.

Grâce aux améliorations techniques, le nombre de produits naturels découverts ces dernières années dépasse le million. Cinquante à 60% de ces composés sont produits par les plantes et 5% environ ont une origine microbienne [120]. Historiquement, de tous les micro-organismes étudiés, les Actinomycètes et les champignons se sont avérés être les meilleurs producteurs de métabolites secondaires, ils sont indispensables à la santé de tous les écosystèmes [121].

Aujourd'hui et grâce aux études menées depuis une vingtaine d'années, de grandes classes de molécules synthétisées par les endophytes ont pu être mises en évidence comme : les alcaloïdes, les terpènes, les stéroïdes [122].

Tableau 5 : quelques classes de molécules produites par les endophytes

Classes	Définitions	Exemples	Activités	Références
Alcaloïdes	Substances naturelles réagissant comme des bases	• Camptothécine	• Agent antinéoplasique	[123] [124] [125]
		• Vinblastine	• Anticancéreux	[126]
		• Hypéricine	• Antidépresseur	[127] [128]
Phénols	Composés chimiques aromatiques portant une fonction hydroxyle –OH	• Pestalochlorides A et B	• Antifongique	[84] [122] [129]
Terpénoïdes	Hydrocarbures naturels dérivés de l'isoprène	• Subglutinol A	• Immunosuppresseur	[130]
		• Paclitaxel	• Anticancéreux	[131]
Peptides	Polymères d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques	• Cryptocandine A	• Antifongique	[130] [132]
		• Echinocandines A, B, D et H	• Antibactériens	[133]

De nombreux autres composés appartenant à des classes chimiques différentes ont été décrites comme les aldéhydes, chromones, cyclohexanones, esters, lactones, xanthonnes etc [128].

2.3.3. Métabolites issus des endophytes et présentant un intérêt pharmacologique

Des extraits de tout type de plantes indigènes sont utilisés de manière traditionnelle pour le traitement d'affections diverses à travers le monde [134]. Les produits naturels,

métabolites ou dérivés de micro-organismes, plantes ou animaux ont été exploités par l'Homme depuis des millénaires et les plantes ont été la principale source de composés utilisés en médecine. La Nature fournit un pool invraisemblable de molécules complexes, infiniment plus sophistiquées que toutes les molécules issues d'une autre source chimique qu'elle soit synthétique ou combinatoire [135]. De plus ces plantes regorgent d'endophytes qui sont eux aussi de potentielles sources de nouveaux produits naturels exploitables en médecine, en agriculture et dans l'industrie. Il y a 3000 ans, les mayas utilisaient déjà les champignons poussant sur le maïs vert pour traiter les affections intestinales. Plus récemment, les moines bénédictins ont commencé à utiliser *Papaver somniferum* en tant qu'anesthésique et anti-douleur comme les grecs l'avaient fait des années plus tôt.

Jusqu'à ce que Pasteur découvre que la fermentation était le fruit de cellules vivantes, les chercheurs ne considéraient pas les micro-organismes comme source sérieuse de molécules. Puis le heureux hasard, ou la découverte fortuite et la force d'observation a permis à Fleming d'entrer dans l'ère des antibiotiques via la découverte de la pénicilline isolée à partir du champignon *Penicillium notatum*. Depuis, les recherches se sont portées sur les métabolites microbiens présentant une activité vis – à – vis des pathogènes humains, animaux et végétaux.

De plus, la découverte d'une myriade de microbes avec des applications qui balaient un large spectre en médecine, les anticancéreux et les immunosuppresseurs, en agriculture et dans l'industrie est rendue possible grâce au développement de nouveaux procédés sophistiqués de screening.

Tan and Zou pensent que la capacité des endophytes à produire certains composés phytochimiques premièrement synthétisés par les hôtes est due à une recombinaison génétique du support de l'information des endophytes dans l'évolution de leur interaction avec leurs hôtes [133]. Ainsi, si les endophytes peuvent produire les mêmes composés bioactifs rares et importants que leurs hôtes alors cela permettrait non seulement de réduire la nécessité de récolter des végétaux poussant lentement mais également de préserver la biodiversité.

De nombreuses causes comme les résistances vis – à – vis des bactéries pathogènes *Staphylococcus*, de *Streptococcus* ou de *Mycobacterium*, l'apparition de virus mortels, les immunodéprimés susceptibles aux pathogènes opportunistes tel *Aspergillus* spp. ou encore *Candida* spp., ainsi que toutes les infections parasitaires, malaria, trypanomiasis, le virus du

SIDA, la tuberculose et les cancers nécessitent des traitements efficaces, sûrs et avec un faible impact environnemental [130]. Ces réponses pourraient être apportées par les endophytes et leur production de métabolites.

Les molécules produites par les endophytes peuvent être des molécules initialement synthétisées par l'hôte végétal ou alors elles peuvent être de nouvelles molécules, non communément retrouvées chez les plantes.

- **Endophytes, sources alternatives de molécules initialement étudiées chez la plante hôte**

- *Anticancéreux*

Le cancer regroupe plusieurs pathologies qui peuvent affecter des organes variés du corps. Il est caractérisé par la croissance incontrôlée de cellules anormales et l'invasion de tissus normaux. Les cellules cancéreuses peuvent aussi se répandre à d'autres parties du corps et constituer de nouvelles tumeurs. Si l'invasion devient incontrôlable, cela peut conduire à la mort.

En 2007, il a été estimé que le cancer a tué presque 8 millions de personnes à travers le monde. Le nombre de morts par cancer pourrait atteindre 17,5 millions en 2050 simplement dû au vieillissement de la population, aux influences environnementales et aux habitudes de vie comme la cigarette et l'exposition à des substances cancérogènes. De plus, les cancers multi-résistants à certaines chimiothérapies compliquent les traitements [128].

L'une des entreprises les plus fructueuses concernant les produits naturels isolés à partir d'endophytes reste sans aucun doute l'anticancéreux paclitaxel de son nom commercial le Taxol® découvert en 1971 [136]. Ce composé, initialement isolé à partir de l'if du Pacifique, *Taxus brevifolia* [137] plante médicinale traditionnellement utilisée par les autochtones américains, est un médicament stabilisateur des microtubules utilisé dans le traitement des cancers ovariens, pulmonaires, du sein et dans le sarcome de Kaposi notamment [138].

Les fortes demandes en taxol ont conduit à une déplétion sévère en *Taxus brevifolia*. Le coût de fabrication du taxol ainsi que les inquiétudes écologiques concernant l'if du Pacifique ont conduit de nombreux laboratoires à travers le monde à tenter de produire de manière synthétique cette molécule ou via des cultures de tissus et de cellules végétales.

Cependant, à cause de la complexité de la molécule ces efforts ont été infructueux. Les recherches se sont alors portées sur les endophytes vivant dans ces arbres et ont révélé que certains champignons comme *Taxomyces andreanae* pouvaient aussi produire le même composé [131] [115].

De nombreux autres endophytes isolés à partir d'hôtes différents ont la capacité de produire le paclitaxel avec des rendements différents (**tableau 6**). En effet, ces quantités sont de l'ordre de 0,03 µg/l pour l'endophyte *Periconia* sp. et peuvent aller jusqu'à 245 µg/l pour *Lasiodiplodia theobromae*.

Tableau 6 : liste des endophytes fongiques capables de produire du paclitaxel [127].

Host	Endophytic fungus	Yield(µg/l)
<i>Taxus brevifolia</i>	<i>Taxomyces andreanae</i>	0.024–0.05
<i>Taxus yunnanensis</i>	Unidentified	–
<i>Taxus wallichiana</i>	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	0.06–0.07
<i>Taxodium distichum</i>	<i>P. microspora</i>	0.05–1.49
<i>Wollemia nobilis</i>	<i>Pestalotiopsis guelpini</i>	0.17
<i>Torreya grandifolia</i>	<i>Periconia</i> sp.	0.03–0.83
<i>Ginkgo biloba</i>	<i>Alternaria</i> sp.	0.12–0.26
<i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairei</i>	<i>Tubercularia</i> sp.	185.4
<i>T. chinensis</i> var. <i>mairei</i>	<i>Ozonium</i> sp.	4–18
<i>T. chinensis</i>	<i>Fusarium solani</i> , Tax-3	163.35
<i>Pestalotiopsis versicolor</i>	<i>Taxus cuspidata</i>	478
<i>T. chinensis</i> var. <i>mairei</i> .	EFY-21 (<i>Ozonium</i> sp.)	–
<i>Taxus globosa</i>	<i>Nigrospora</i> sp.	0.142–0.221
<i>Morinda citrifolia</i> Linn.	<i>Botryodiplodia theobromae</i> Pat.	–
<i>M. citrifolia</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	245
<i>Aloe vera</i>	<i>Phoma</i> species	73.66
<i>Capsicum annuum</i>	<i>Colletotrichum capsici</i>	687
<i>Taxus x media</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> MD2	–
<i>T. chinensis</i> var. <i>mairei</i>	<i>Didymostilbe</i> sp.	8–15
Plant debris	<i>Pestalotiopsis malicola</i>	186
<i>Taxus baccata</i>	<i>Gliocladium</i> sp.	1,670 ng/200 ml

Le paclitaxel (**figure 17**) est un métabolite secondaire de la classe des terpénoïdes, il s'agit plus précisément d'un diterpénoïde. Cette molécule serait une molécule de défense pour la plante en empêchant la croissance de certains champignons pathogènes pour l'hôte [139].

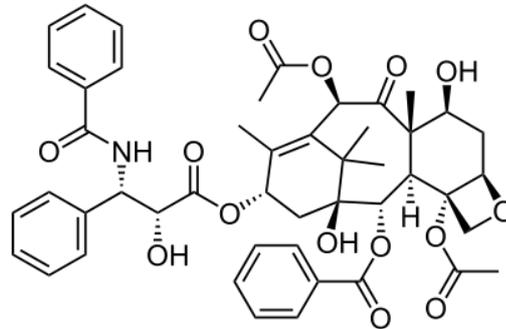


Figure 17 : structure du paclitaxel [140].

Les propriétés anticancéreuses du Taxol® sont dues au fait que le paclitaxel est un poison du fuseau mitotique : il va stimuler l'assemblage des dimères de tubuline en microtubules et inhiber leur polymérisation [141]. Le paclitaxel va ainsi bloquer la réplication des cellules eucaryotes à la fin de la phase G2 du cycle cellulaire (**figure 18**).

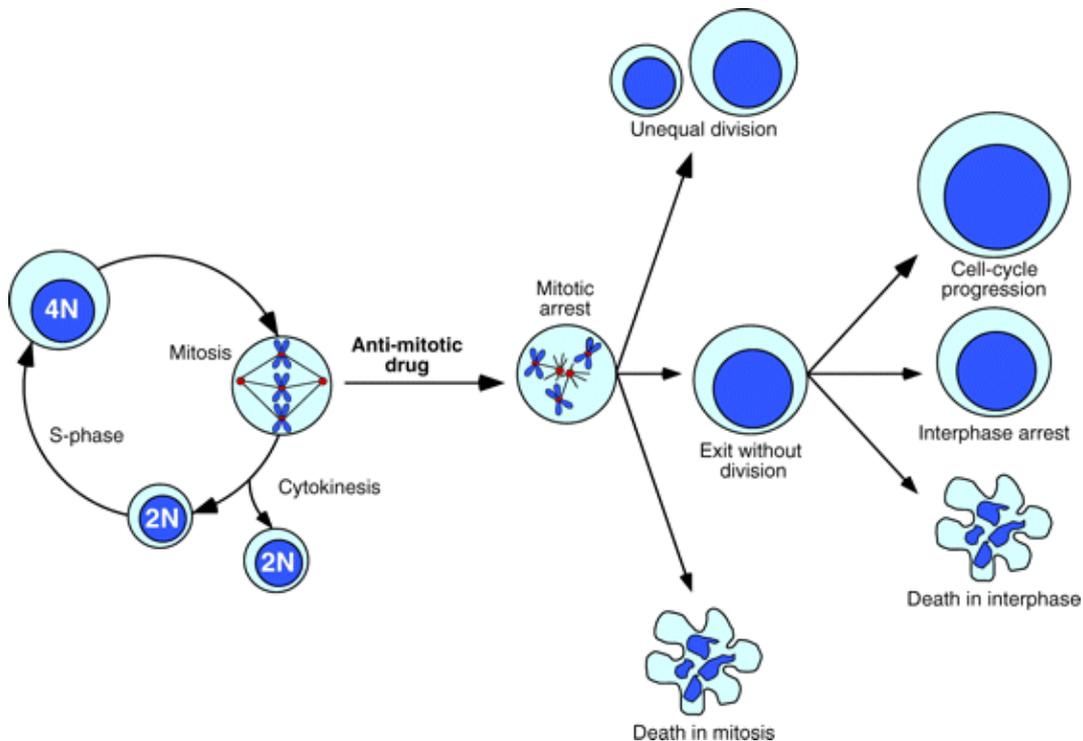


Figure 18 : destin cellulaire en réponse à un agent anti-mitotique. Lorsque les cellules sont exposées à un composé anti-mitotique comme le Taxol®, leur cycle s'arrête en mitose du fait d'une activation chronique du point de contrôle des fuseaux mitotiques. Puis elles suivent différents sorts : elles peuvent directement mourir en mitose ou se diviser de manière inégale produisant ainsi des cellules filles aneuploïdes. Alternativement, les cellules peuvent sortir de la mitose sans division et dans ce cas là, elles mourront en interphase, s'arrêteront en

interphase indéfiniment ou entreront dans un cycle cellulaire supplémentaire sans division [142].

Les microtubules sont formés à partir de l'assemblage de dimères de tubuline, protéines de structure α et β . Ces tubulines peuvent se dimériser pour former un dimère de tubuline. Les microtubules sont dans un état d'équilibre dynamique pour former un dimère de tubuline. La présence de guanosine triphosphate (GTP) et une température de 37°C favorisent la formation de la forme microtubule (polymérisée) au profit de la forme dimère de tubuline (dépolymérisée). A l'inverse, la présence de calcium combinée à une température faible va favoriser la dépolymérisation des microtubules.

La paclitaxel va rompre cet équilibre en le déplaçant vers la forme polymérisée au profit de la forme dépolymérisée (**figure 19**). Cette action a pour conséquence une baisse critique de la concentration en tubulines nécessaires à la formation des microtubules [141].

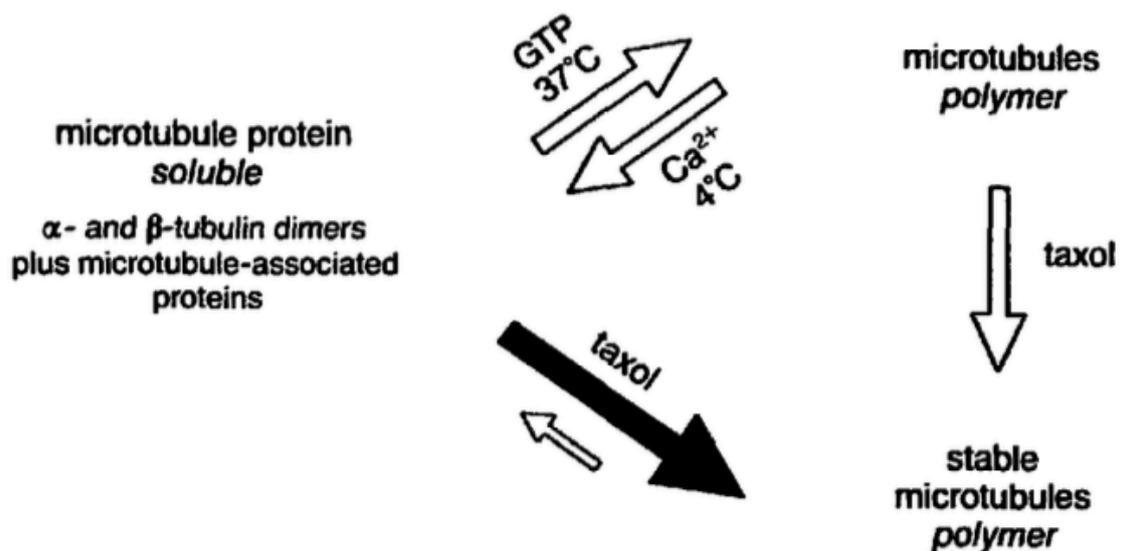


Figure 19 : le taxol stabilise la formation de microtubules au profit de la forme tubuline [141].

Depuis, d'autres anticancéreux produits par les endophytes fongiques ont été décrits comme par exemple la podophyllotoxine.

La podophyllotoxine (**figure 20**) est un composé appartenant au groupe chimique des lignanes, initialement isolé à partir des rhizomes et des racines de certaines espèces de *Podophyllum*, présentant une activité antinéoplasique.

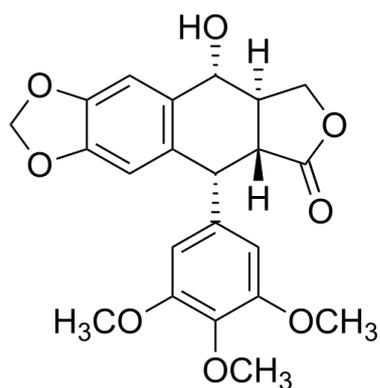


Figure 20 : structure de la podophyllotoxine [143].

Cette molécule est utilisée comme précurseur de synthèse de médicaments anti-tumoraux comme l'étoposide (VP – 16 – 213) et la téniposide (VM – 26) utilisés dans le traitement du cancer du poumon, des testicules, certaines leucémies et d'autres tumeurs solides. Cette molécule agit comme un inhibiteur de mitose en se fixant de manière réversible à la tubuline et en inhibant l'assemblage des microtubules.

Due à une demande croissante pour la podophyllotoxine, à une surexploitation des espèces de *Podophyllum* et un manque d'organisation dans leur culture, la plante est en danger de disparition. Pour tenter d'y remédier, les chercheurs ont mis au point une synthèse totale de la podophyllotoxine mais qui est non viable d'un point de vue économique à cause de ses faibles rendements. La production agricole de la *Podophyllum* n'a pas eu non plus le succès escompté dans la mesure où les végétaux nécessitent certaines conditions climatiques difficilement reproductibles. Les voies biotechnologiques également ont été un échec : les cultures de cellules ou de tissus et les cultures de racines n'ont pas donné des rendements assez importants.

Par conséquent, des approches alternatives pour la production de cette molécule via des endophytes fongiques ont été explorées. Plusieurs études montrent une production de podophyllotoxine par différents endophytes (**tableau 7**).

De nombreux endophytes différents et isolés de différentes plantes sont capables de produire la même molécule, la podophyllotoxine dans ce cas-là, en quantités variables. Par exemple, d'après le **tableau 7**, *Phialocephala fortinii* isolé de *Podophyllum peltatum* est capable de produire entre 0,5 et 189 µg/l de la molécule bioactive alors qu'*Alternaria neesex* isolé à partir de *Sinopodophyllum hexandrum* ne produit que 2,4 µg/l.

Tableau 7 : liste des endophytes fongiques produisant de la podophyllotoxine [127].

Host	Endophytes	Yield
<i>Sinopodophyllum hexandrum</i> (= <i>Podophyllum hexandrum</i>)	<i>Alternaria</i> sp.	–
<i>Juniperus vulgaris</i> (= <i>Sabina vulgaris</i>)	<i>Alternaria</i> sp.	–
<i>P. hexandrum</i>	<i>Trametes hirsuta</i>	30 µg/g
<i>Podophyllum peltatum</i>	<i>Phialocephala fortinii</i>	0.5–189 µg/l
<i>S. hexandrum</i>	<i>Alternaria neesex</i>	2.4 µg/l
<i>Juniperus recurva</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	28 µg/g
<i>Juniperus communis</i> L. Horstmann	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius	DPDT 0.04 µg/g dry mycelia and 3.0 µg/l broth
<i>P. hexandrum</i>	<i>Fusarium solani</i> , P1	29.0 µg/g

Les endophytes produisent de nombreuses molécules possédant une activité anticancéreuse efficace. D'autres exemples pourraient être cités comme la vincristine et la vinblastine initialement isolés de la pervenche de Madagascar [126] ou bien la camptothécine issue de la médecine traditionnelle chinoise, trop cytotoxique pour être utilisée directement en thérapeutique mais servant de précurseurs de synthèse pour l'irinotécan [144] et le topotécan [145].

- *Antidépresseurs*

La dépression est un sérieux désordre mental qui affecte profondément la qualité de vie du malade. A ce jour, presque 16% de la population mondiale est affectée par ce trouble et d'après l'Organisation Mondiale de la Santé, d'ici 2030 la dépression représentera un handicap majeur [146].

Des traitements à base de plantes existent. En effet, les plantes du genre *Hypericum*, et plus spécialement *H. perforatum*, ont longtemps été utilisées comme plantes en médecine traditionnelle, ayurvédique et populaire à travers le monde pour leur efficacité thérapeutique : déjà dans la Grèce Antique elle était utilisée en tant qu'antidépresseur [147].

Leurs constituants principaux présentant une activité pharmacologique sont les naphthodianthrones avec en chef de file l'hypéricine et la pseudohypéricine.

Aujourd'hui, les applications phytothérapeutiques du millepertuis perforé sont des applications en tant qu'antidépresseurs, pour la cicatrisation des plaies, pour ses propriétés anti-inflammatoires, antimicrobiennes et anti-oxydantes notamment.

La biosynthèse de l'hypéricine (**figure 21, 1**) est peu connue. Elle est présumée formée à partir de l'émodine (**figure 21, 2**), précurseur initial. Cependant, rien n'est connu

concernant les étapes dans le millepertuis ou les autres plantes synthétisant cette molécule conduisant à la protohypéricine et donc à l'hypéricine.

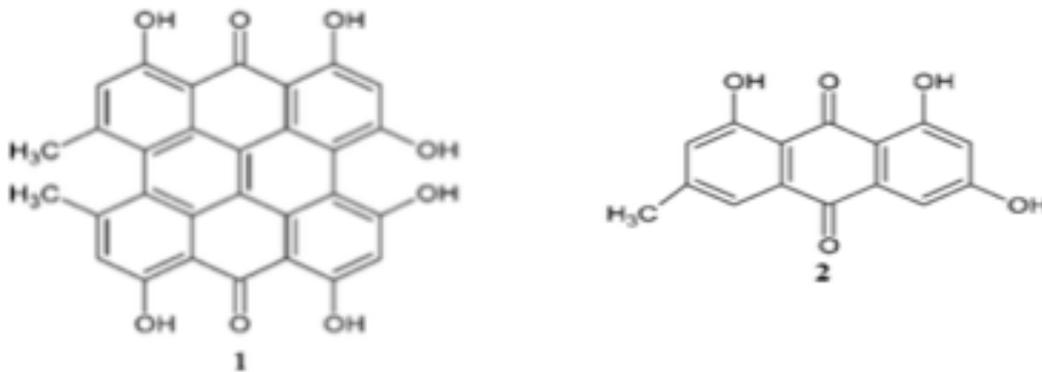


Figure 21 : structures de l'hypéricine et de l'émodine [147]

L'hypéricine n'est pas un composé abondant. Il est disponible seulement dans les plantes du genre *Hypericum*, ce qui demande malheureusement le déracinement de ces végétaux relativement rares. De ce fait, il existe un problème d'approvisionnement en hypéricine pour répondre à la demande pharmaceutique. Il est donc indispensable de trouver une alternative, alternative qui pourrait résider dans la fermentation d'un micro-organisme promettant une productivité reproductible et fiable.

Kusari & al ont isolé un endophyte fongique, INFU/Hp/KF/34B, d'*H. perforatum*, *Thielavia subthermophila*, collecté dans des populations naturelles en Inde, capable de produire de l'hypéricine à partir de l'émodine. En effet, l'analyse des composés extraits de la biomasse de l'endophyte fongique INFU/Hp/KF/34B en spectroscopie de masse haute résolution a révélé des spectres de masse des molécules produites identiques à l'émodine et l'hypéricine commerciales permettant de penser que ces molécules sont identiques aux standards.(**figure 22**) [148].

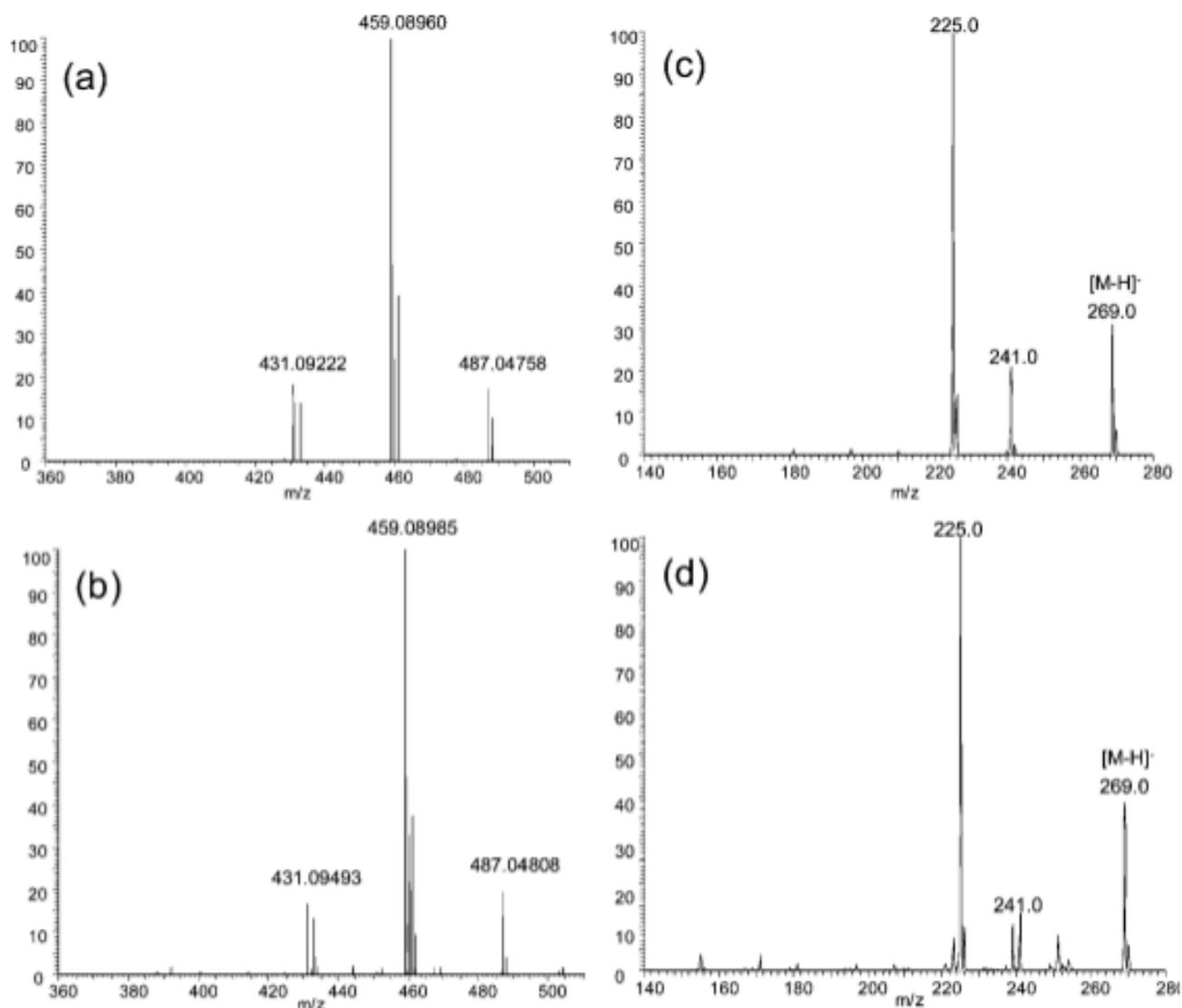


Figure 22 : spectres ESI-MS/MS, mode d'ionisation négatif haute résolution de (a) standard d'hypericine, (b) hypericine fongique, (c) standard d'émودية et (d) émودية fongique [147].

La découverte d'un endophyte équipé d'une machinerie enzymatique nécessaire à l'accumulation de ces deux molécules soulèvent des questions quant à ses capacités de production et ses futures applications scientifiques et industrielles possibles.

Le développement de techniques modernes de biotechnologie offre des opportunités indéniables pour l'amélioration significative de la production de métabolites secondaires bioactifs. En effet, les méthodes de co-culture, d'ingénierie génétique de transfert, surexpression ou modification des gènes limitant les voies métaboliques d'intérêt et les procédés de fermentation microbienne peuvent présenter un grand potentiel dans la production industrielle de tels composés [149] [150].

- **Endophytes, sources de nouveaux composés bioactifs**

Les exemples qui suivent représentent une liste non exhaustive de composés bioactifs.

- ***Insulinomimétique***

Le diabète est un problème majeur de santé publique par sa prévalence croissante et son impact-socioéconomique. Selon les estimations de l’OMS, plus de 350 millions de personnes dans le monde sont atteintes de diabète et ce chiffre risque d’être multiplié par deux d’ici 2030. Il existe deux types de diabète. Le diabète de type I, insulino-dépendant, causé par la destruction des cellules bêta du pancréas et entraînant l’incapacité de la personne atteinte à sécréter de l’insuline. Le diabète de type II, aussi appelé diabète sucré se caractérise quant à lui par une résistance à l’insuline et se traduit par une élévation chronique de la glycémie [151].

Un métabolite fongique (L-783,281) a été isolé d’un endophyte fongique, *Pseudomassaria* sp., récolté à partir d’une plante de la forêt tropicale de la République Démocratique du Congo non loin de Kinshasa [130]. Ce composé agit comme un insulino-mimétique, il active les récepteurs de l’insuline, mais contrairement à l’insuline, il n’est pas détruit dans le tractus digestif et peut être donné oralement. L’administration orale de la molécule L-783,281 à deux modèles murins différents a induit une diminution significative de la glycémie [152].

- ***Anti-infectieux***

En 1981, un nouveau syndrome est apparu dans la population humaine mondiale caractérisé par une déficience du système immunitaire. Les patients présentaient des infections inhabituelles comme des pneumonies à *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*) et des sarcomes de Kaposi. Ce syndrome d’immunodéficiência acquise (SIDA) consiste à la réduction du nombre des cellules immunes CD4⁺, une prolifération des lymphocytes B et une hypergammaglobulinémie. Cette découverte reflète une activation du système immunitaire qui a récemment été réapprécié en tant que cause majeure de la pathogénicité. En effet, l’inflammation chronique a reçu une plus grande attention comme cause d’apparition de cancers, de maladies cardiovasculaires et d’autres comorbidités apparaissant au long terme chez les personnes infectées au virus de l’immunodéficiência humaine (VIH) [153].

Depuis cette découverte il y a trois décennies, le VIH a infecté au moins 60 millions de personnes et causé la mort de plus de 25 millions de malades surtout dans les pays en voie

de développement [154]. Même si les traitements antirétroviraux ont réduit le nombre de morts du SIDA, l'accès au traitement n'est pas universel et il peut conduire à l'émergence de souches virales résistantes.

La plupart des médicaments antirétroviraux utilisés aujourd'hui sont synthétisés chimiquement dans les laboratoires. Même si cette approche a permis de trouver et de produire assez facilement des drogues inhibant le VIH, ces molécules ne sont pas capables d'éradiquer le virus chez les patients atteints ainsi qu'éviter les effets indésirables et les résistances. De ce fait, explorer de nouveaux chemins pourrait conduire au développement d'un meilleur traitement ou d'options de prévention [155].

Une source relativement inexploité de traitements contre le VIH réside dans les produits naturels retrouvés dans les plantes et leurs champignons associés [121].

Dans leurs recherches, Wellensiek et ses collègues ont évalué la capacité d'inhibition de réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T (LT) de plusieurs centaines d'extraits d'endophytes fongiques, *Alternaria tenuissima*, isolés du chêne d'Emory du désert du Sonoran (sud de la Californie et de l'Arizona) *Quercus emoryi* [155].

Pour cela, ils ont d'abord déterminé la cytotoxicité des extraits fongiques vis-à-vis des LT en incubant une lignée de LT4 avec plusieurs concentrations d'extraits sur une période de 9 jours (**figure 23**).

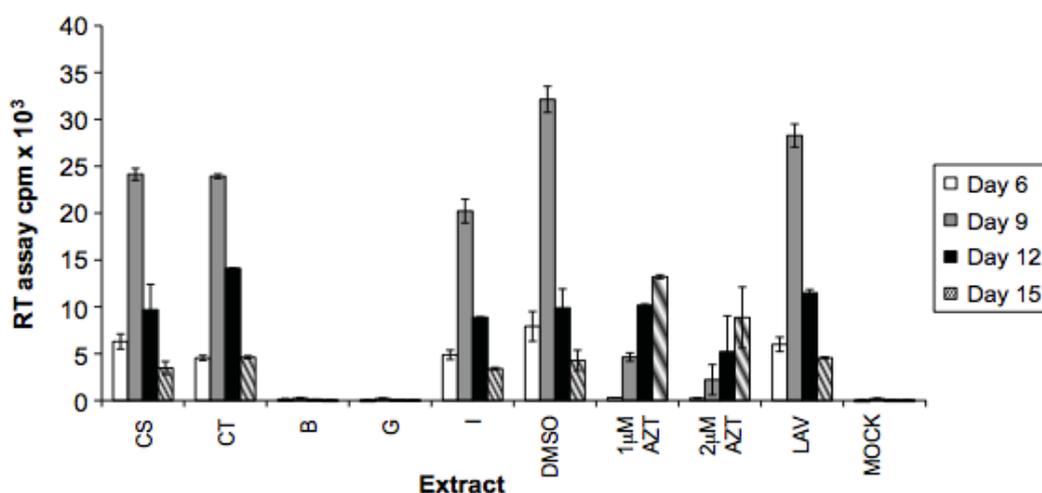


Figure 23 : effet des extraits d'endophytes fongiques sur la réplication du VIH-1. Résultats observés sur 100 échantillons testés. Les cellules A3.01 ont été infectées avec le VIH-1 en présence des extraits CS, CT, B, G, et I à concentration de 2µg/ml. Les contrôles ont été inclus : DMSO, inhibition positive de la réplication virale (1µM et 2µM AZT), absence d'extrait fongique (LAV) et virus (mock). Les niveaux de virus dans le surnageant a été déterminé par analyse de la transcriptase inverse (RT assay) [155].

La comparaison a été effectuée avec le DMSO comme contrôle et l'Azidothymidine (AZT), inhibiteur de la transcriptase inverse (TI) connu comme contrôle positif.

Ils ont identifié plusieurs composés, appartenant à la classe des pigments naturels les pérylènequinones, capables d'inhiber fortement voire totalement (extraits B, G et I) la réplication du virus. Ces résultats sont prometteurs pour le développement futur de nouveaux médicaments anti-HIV d'origine endophytique.

Les agents antibactériens connaissent aujourd'hui un manque de nouvelles molécules cliniquement testées. De nouveaux modèles antibactériens présentant de nouveaux mécanismes d'action pourraient donc être avantageux par rapport aux antibiotiques déjà existants et spécialement ceux luttant contre des pathogènes multi-résistants et émergents [91].

Le guanacastepene, est un nouveau diterpénoïde produit par un endophyte fongique isolé du *Daphnopsis americana* poussant au Costa Rica. Cette molécule pourrait représenter une nouvelle classe d'agents antibactériens montrant une activité contre les *Staphylococcus aureus* méthicilline-résistants et contre les *Enterococcus faecium* vancomycine-résistants [156].

L'enfumafungine est également un triterpénoïde antifongique produit par *Hormonema* sp., endophyte fongique de *Juniperus communis*. Cette molécule a montré un potentiel antifongique important in vitro vis-à-vis de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Aspergillus fumigatus* et *Saccharomyces cerevisiae*. Dans des modèles murins, cette activité anti-candida s'est montrée plus modérée [157].

- **Immunosuppresseur**

La recherche de nouveaux immunosuppresseurs isolés à partir d'endophytes à mener à la découverte du subglutanol A et B. Ces deux diterpènes produits par *Fusarium subglutinans* isolé de la vigne grimpante *Tripterygium wilfordii* ont montré une activité immunosuppressive sans causer les effets cytotoxiques caractéristiques de la cyclosporine A [158][159].

- **Anticancéreux**

D'autres composés exclusivement isolés de souches fongiques sont les séquoiatones A et B isolés à partir de l'endophyte *Aspergillus parasiticus* associé au *Sequoia sempervirens*.

Ces molécules ont montré une activité modérée et sélective contre les cellules tumorales humaines avec une grande efficacité contre le cancer du sein [160].

Grâce aux nombreuses découvertes déjà réalisées, les endophytes fongiques laissent présager être une source intarissable de nouveaux composés naturels et bioactifs. Grâce aux technologies modernes comme l'ingénierie génétique, les technologies métaboliques et les procédés de fermentation microbienne, ces micro-organismes sont plus facilement manipulables et les rend plus facilement utilisables. Comparée à la culture des cellules végétales, la culture sur milieu est plus simple et meilleur marché. De plus, le temps de fermentation est plus court et les milieux de culture optimisés peuvent considérablement améliorer et contrôler la croissance microbienne [123].

Cependant, la production des composés bioactifs désirés par les endophytes fongiques à un niveau industriel reste un objectif à atteindre dans certains cas. En effet, un obstacle majeur à une application industrielle est la réduction de production de métabolites secondaires au fur et à mesure des cultures sous conditions axéniques. En considérant le fait que les endophytes résident à l'intérieur des plantes et qu'ils sont constamment en communication avec leurs hôtes, il semble assez éloquent que les plantes jouent un rôle capital dans les processus métaboliques *in planta* des endophytes. Ainsi, la culture *in vitro* peut impacter la nature et la quantité de métabolites produits par les endophytes [34] [38].

PARTIE III : Biotransformations microbiennes

Les biotransformations, connues et utilisées depuis la nuit des temps notamment dans le brassage et la vinification, peuvent être définies comme l'utilisation de systèmes biologiques pour apporter des modifications chimiques aux composés que leurs précurseurs n'ont pas. Pour réaliser ces changements, les micro-organismes dans leur globalité ou bien seulement leurs systèmes enzymatiques peuvent être utilisés [161].

Les champignons ont usuellement été les systèmes cellulaires complets les plus étudiés en termes d'isolement de produits naturels d'origine microbienne et également pour leurs réactions de biotransformations.

1. Biotransformations : généralités

La molécule d'intérêt est modifiée par une transformation de ses groupes fonctionnels avec ou sans la dégradation de son squelette carboné. De telles modifications conduisent à la formation de nouvelles molécules bioactives qui peuvent être, techniquement, difficiles à préparer par les méthodes chimiques conventionnelles [162].

Ces transformations ont beaucoup d'avantages comparés aux méthodes chimiques : (1) les procédés sont réalisés sous conditions douces ne nécessitant pas la protection des autres groupes fonctionnels [161], (2) les réactions sont réalisées dans des conditions écologiques acceptables réduisant l'impact environnemental [163]. De plus, la régio- et la stéréosélectivité ainsi que la spécificité des enzymes impliquées dans ces méthodes biotechnologiques permettent une production de composés énantiomériquement purs. Les étapes de séparation ne sont donc plus nécessaires [164].

Enfin, les bioconversions sont en général moins chères [165] et plus directes que leurs analogues chimiques avec moins de formations d'intermédiaires [161] [166]. Parmi les produits obtenus après bioconversion, beaucoup ont des applications très diverses : arômes, produits agrochimiques, antibiotiques, antioxydants et agents anticancéreux [167].

Les micro-organismes sont capables de réaliser un grand nombre de transformations : hydroxylation, époxydation, réaction de Baeyer – Villiger, déracémisation, réduction stéréo- et énantiosélective et oxydation.

2.1 Hydroxylation

Le processus d'hydroxylation implique l'oxydation directe d'une liaison C – H de manière à produire un alcool C – OH. Ces réactions, très répandues, peuvent avoir lieu à différents endroits de la molécule et spécialement au niveau des centres inactivés qui sont difficiles à modifier par les méthodes chimiques classiques.

L'utilisation d'hydroxylation microbienne pour la production d'hydroxystéroïdes spécifiques est une vieille histoire. Pourtant l'exploitation de ce procédé pour la production de ces métabolites en tant que produits pharmaceutiques est beaucoup plus récente [168].

En effet, récemment, plusieurs micro-organismes ont été décrits comme étant capables de convertir le progestomimétique Trimégestone®, progestatif indiqué en combinaison avec le 17 β -estradiol dans le traitement substitutif des troubles vasomoteurs de la ménopause et la prévention de l'ostéoporose, en dérivés hydroxylés.

Cette remarquable capacité des endophytes fongiques à hydroxyler les stéroïdes vient du fait qu'ils possèdent toute la machinerie enzymatique nécessaire pour se défendre contre les métabolites secondaires des plantes hôtes tels les alcaloïdes stéroïdiens comme la tomatine et la tomatidine [169].

Le limonène est le monoterpène monocyclique le plus abondant naturellement et représente jusqu'à 90% de l'huile essentielle d'écorce d'orange, dérivé d'agrumes très intéressant et bon marché. Ainsi, le limonène est devenu le précurseur le plus étudié des travaux de bioconversions pour la production de dérivés à haute valeur ajoutée, ce qui peut être une bonne stratégie dans l'industrie agro-alimentaire [170].

De nombreux autres exemples d'hydroxylation sont décrits dans la littérature et concernent tous les types de terpènes : monoterpènes acycliques (linalol, nérol, géraniol), monoterpènes bicycliques (pinènes), sesquiterpènes (farnésol).

Grâce à leur capacité à hydroxyler et leurs nombreuses applications, l'utilisation des différentes espèces de *Pseudomonas* en tant qu'agents de catalyse a permis d'étendre leur utilisation dans l'Industrie du parfum et des arômes et à déposer de nombreux brevets (**tableau 8**).

Tableau 8 : brevets déposés de biotransformations réalisés par *Pseudomonas* spp et d'intérêt industriel [171]

Substrate	Product	Biocatalyst	Patent inventors	Patent number
Eugenol	Vanillin	<i>Pseudomonas</i> sp. TK2102	Washisu et al. (1993)	JP patent 5227980
Eugenol/ferulic acid	Vanillin	<i>P. putida</i> (ATCC 55180)	Labuda et al. (1992)	US patent 5128253
Natural stilbenes	Vanillin	<i>Pseudomonas</i> sp.	Yoshimoto et al. (1990)	JP patent 2195871
Natural stilbenes	Vanillin	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cheetham et al. (2005)	US patent 6844019
α - and β -Pinene	Carvone	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rhodes e Winskill (1985)	US patent 4495284
Citral	Geranic acid	<i>Pseudomonas convexa</i>	Hayashi et al. (1967)	Patent 41254
Ketocampholenic acid	Derivatives	<i>Pseudomonas</i> sp.	Selifonov (2006)	US patent 2006/0111270 A1
Maleic acid	L-aspartic acid	<i>P. fluorescens, P. ovalis</i>	Sakano et al. (1999)	US patent 5939296
			Takamura et al. (1968)	US patent 3391059
			Kato et al. (1998)	US patent 5741681
Ammonium fumarate	L-aspartic acid	<i>P. aeruginosa</i>	Chibata et al. (1974)	JP patent 3791926
Nicotine	Pyridines	<i>Pseudomonas</i> spp.	Kiener et al. (1998)	US patent 5760236
Phenylacetate	Mandelate	<i>P. putida</i>	Geusz and Anderson (1992)	US patent 515153

2.2 Sulfoxydation

La sulfoxydation est un procédé chimique qui consiste à ajouter un groupe acide sulfonique, SO₂OH, sur une structure carbonée en la faisant réagir en présence de dioxyde de soufre et d'oxygène (équation 1).

Équation 1 : réaction de sulfonation d'un alcane linéaire



Ces dernières années, les sulfoxydes chiraux sont devenus d'importants éléments constitutifs de la synthèse de composés biologiquement actifs et pharmaceutiques.

Les micro-organismes sont très utilisés pour produire des sulfoxydes chiraux présentant une très grande régio- et stéréosélectivité.

Par exemple, *Beauveria bassiana*, utilisé en lutte biologique contre les insectes tels les termites, est capable de bioconvertir l'acide benzhydrylsulfanyl acétique en acide-(S)-sulfanyl carboxylique (**figure 24**) avec un très bon rendement (89%) et avec une grande énantiosélectivité (99%). Ce composé peut être utilisé pour la synthèse du modafinil qui est un agent psychostimulant prescrit dans la narcolepsie.

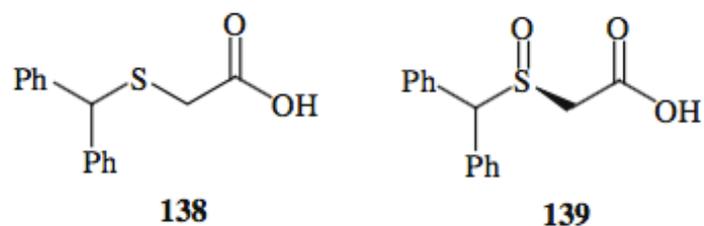


Figure 24 : biotransformation de l'acide benzhydrylsulfanyl acétique 138 par *Beauveria bassiana* [162].

2.3 Epoxydation

Les époxydes sont des substances chimiques comportant un oxygène ponté sur une liaison carbone – carbone. Ils sont généralement produits par époxydation d'alcènes [172].

Les époxydes sont souvent formés au cours de la biotransformation de différents terpénoïdes. Ces derniers constituent le groupe le plus large de produits naturels et sont retrouvés dans les royaumes animaux, végétaux et microbiens. Ils offrent une grande variété de senteurs florales et agréables. Les huiles essentielles représentent une source abondante de terpénoïdes : elle consiste en un mélange de terpènes ou sesquiterpènes, alcools, aldéhydes, cétones, acides et esters.

Dans son étude, Demyttenaere a mis en évidence la biotransformation du linalol par *Pseudomonas incognita* qui réalise une époxydation [173].

2.4 Réaction de Baeyer – Villiger

Le réarrangement de Baeyer – Villiger ou oxydation de Baeyer – Villiger (**figure 25**) est une oxydation de réarrangement utilisée en chimie organique dans laquelle une cétone ou un aldéhyde est oxydé en ester ou lactone par réaction avec un peracide. Cette réaction est stéréospécifique et régiosélective [174]. Les micro-organismes sont eux aussi capables de mener à bien cette réaction avec une grande régio- et énantiosélectivité.

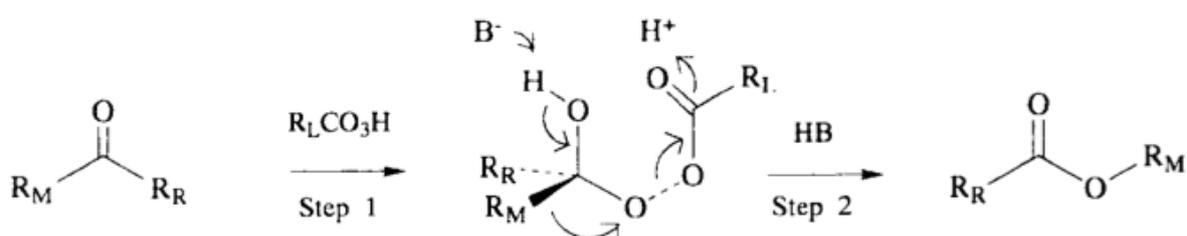


Figure 25 : mécanisme de la réaction de Baeyer – Villiger [174]

Le bicyclohept-2-en-6-one est utilisé dans la synthèse des prostaglandines, potentiellement utilisable en tant que précurseur de certains antibiotiques. Cette cétone a été bioconvertie par différentes souches de *Fusarium* et d'*Aspergillus* [175].

2.5 Déracémisation

La déracémisation est la transformation d'un mélange en proportions égales des énantiomères lévogyre (L) et dextrogyre (D), racémate, en un seul énantiomère, L ou D. Différentes techniques existent [176].

La déracémisation par réduction stéréosélective microbienne ou hydrolyse énantiosélective est une réaction très importante en biocatalyse, pourtant très peu documentée.

Un nombre important de champignons filamenteux thermophiles, champignons pouvant se développer pour des températures allant de 45 à 62°C, ont été étudiés pour leur capacité à biotransformer de manière énantiomérique et énantiotopique. Les hydrolases isolées à partir de champignons thermophiles ont été étudiées en utilisant un test stéréosélectif. Les résultats ont indiqué que ces enzymes pouvaient être plus performantes d'un point de vue de sélectivité énantiomérique ou de degré de sélectivité énantiotopique par rapport aux lipases fongiques déjà commercialisées [177].

La déracémisation par oxydation et par bioréduction énantiosélective d'acétophénone et de ses dérivés par différents champignons a pu être étudiée. Certaines études publiées ces dernières années ont montré la déracémisation d'intermédiaires de synthèse de produits pharmaceutiques et agrochimiques intéressants entrant dans la synthèse de nombreux composés bioactifs.

Par exemple, les amino-alcools chiraux sont largement utilisés en tant que ligands de catalyse asymétrique et en tant qu'auxiliaires chiraux mais sont également d'importants éléments structuraux de médicaments tels les β -bloquants et les inhibiteurs du VIH [178].

Cependant, les méthodes de production de ces composés se trouvent parfois être très onéreuses. Une méthode biologique de déracémisation des racémates, des amino-alcools ou des précurseurs synthétiques pourrait être avantageuse. L'utilisation de micro-organismes complets permettrait de catalyser la déracémisation des alcools secondaires et des diols.

En effet, les cellules contiennent des déhydrogénases qui régissent les étapes d'oxydation et de réduction avec les cofacteurs recyclés en interne. L'hypothèse est qu'une telle efficacité de déracémisation serait due à la compartimentalisation cellulaire des enzymes

catalysant chaque étape. De plus, seulement une seule étape nécessiterait d'être énantiosélective pour une déracémisation réussie [179].

2.6 Réductions stéréo- et énantiosélectives des cétones

En chimie, une réduction est une réaction chimique au cours de laquelle un ou plusieurs atomes d'une molécule ou d'un ion gagnent des électrons (**figure 26**). Les réactions de réduction sont souvent difficiles. En effet, les molécules organiques possèdent souvent plusieurs fonctions susceptibles d'être réduites. Il est alors nécessaire de choisir le réactif approprié qui permettra de réduire la fonction désirée sans toucher aux autres. Comme pour les oxydations, il existe plusieurs catégories de réduction [180].



Figure 26 : réduction d'une cétone en un alcool [180].

Ici aussi, l'intérêt d'utiliser des biocatalyseurs dans la synthèse organique est dû au fait de préparer des composés optiquement actifs sous des conditions plutôt écologiques et qui possèdent une importante stéréosélectivité. Une attention particulière a été donnée à la synthèse stéréo et énantiosélective de composés énantiomériquement purs de synthons chiraux nécessaires du fait de la demande croissante pour le développement de nouveaux produits pharmaceutiques et agrochimiques. Les alcools énantiomériquement purs sont particulièrement utiles comme brique de construction pour la synthèse de médicaments comme notamment l'orphénadrine, la fluoxétine, atomoxétine, clopérasatine.

La biotransformation est une méthode pratique pour préparer des alcools chiraux. L'utilisation de toutes les cellules microbiennes est très avantageuse pour la réduction des cétones dans la mesure où il n'est pas nécessaire d'ajouter des cofacteurs pour leur régénération et du fait qu'elle soit considérée comme chimie verte. De ce fait, plusieurs champignons et levures ont été utilisés pour la réduction stéréo- et énantiosélective des cétones.

Par exemple, Javidnia et al. [181], ont montré que parmi certaines plantes et certains micro-organismes comme *Rhodotorula glutinis*, étaient capables de réduire le benzoyl acétonitrile (5a) (**tableau 9**). Le rendement de la bioconversion réalisée par la levure a été remarquable. De plus, la pureté du composé majoritaire obtenu, à savoir le (S) – (-) – 3 – hydroxy – 3 – phényl propanenitrile, a également été grande (**tableau 9**). Ce composé est un précurseur utile pour la synthèse de la (S) – fluoxétine, forme active de l'antidépresseur fluoxétine.

Tableau 9 : résultats de la bioréduction du benzoyl acétonitrile (5a) et du 3-chloropropiophénone (6a) [181].

	Biocatalyst	Time (days)	% conversion	Enantiomeric excess %
Compound 5a				
Microorganisms	<i>R. glutinis</i>	2	99	96 (S)
		4	99	96 (S)
	<i>A. foetidus</i>	2	15	-
		4	70	7 (S)
Compound 6a				
Plants and microorganisms	<i>D. carota</i>	2	0	>99 (S)
		4	25	
	<i>P. sativa</i>	2	30	90 (S)
		4	32	90 (S)
	<i>S. carlbergensis</i>	2	29	65 (S)
		4	29	65 (S)
	<i>R. glutinis</i>	2	70	93 (S)
		4	70	93 (S)
	<i>P. citrinum</i>	2	40	40 (S)
		4	40	40 (S)

2.7 Oxydation

Une oxydation est une réaction au cours de laquelle une espèce perd un ou plusieurs électrons.

La transformation oxydative des monoterpènes abondants et bon marché comme l' α -pinène et R-(+)-limonène a un potentiel considérable pour la production d'une large variété de différents dérivés terpéniques initialement trouvés dans le royaume végétal [182]. Un grand nombre de monoterpènes oxygénés représentent saveur et parfum des huiles essentielles mais présentent également des effets sur la santé. Cependant, de tels produits sont présents en très faibles quantités dans la nature, il n'est donc pas surprenant qu'une alternative soit envisagée.

Par exemple, l'oxydation sélective de l' α -pinène par des biocatalyseurs est une réaction commerciale importante car elle peut mener à un rendement satisfaisant en produits d'intérêt : la verbénone et la verbénol, molécules très chères avoisinant les 3500€/kg.

Tyrtek et al. [182] ont utilisé le champignon psychotrope *Chrysosporium pannorum* A-1 isolé à partir de toundra de l'Arctique. Après deux jours d'incubation avec le substrat, l'hydroxylation allylique de l' α -pinène est la biotransformation la plus caractéristique pour les espèces de *C. pannorum*. Les produits obtenus sont des produits à haute valeur commerciale : les molécules de verbénol et verbénone (**figure 27**).

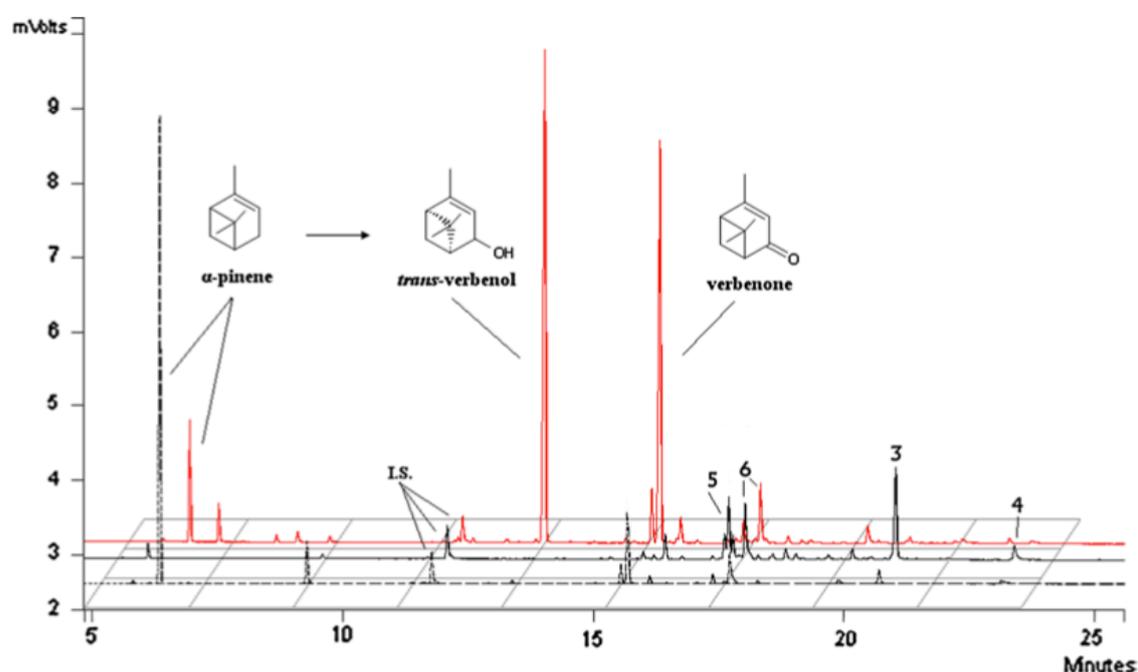


Figure 27 : chromatogrammes GC – FID des mélanges post-réactionnels après 48h (chromatogramme rouge) et 96h (chromatogramme noir) de la bioconversion de l' α -pinène par *Chrysosporium pannorum* A1. Les composés 3 – 6 ne sont pas identifiés. Le chromatogramme en pointillés noirs représente le contrôle d' α -pinène à 48h avec le micro-organisme inactivé par la chaleur.

Du fait de leurs saveurs camphrée et mentholée très prononcées [183], ces molécules sont très utilisées dans l'industrie agroalimentaire et comme intermédiaires dans la synthèse de parfum, de cosmétiques mais également de produits pharmaceutiques.

Une autre raison très importante pour un tel engouement est que la verbénone peut fournir un précurseur chiral nécessaire à la synthèse du paclitaxel [184]. De nombreux genres bactériens, comme *Pseudomonas*, [185] [171] et des espèces fongiques [186] ont été reconnus comme étant des acteurs catalytiques de la bioconversion du pinène même si l'efficacité de la

plupart d'entre eux est limitée par la volatilité et la toxicité du substrat. Mais des résultats prometteurs ont été publiés par Schewe et al [187].

2.8 Applications possibles des transformations microbiennes

Les produits pharmaceutiques sont désignés comme étant des substances possédant des effets biologiques utilisées dans le diagnostic, la prévention ou le traitement des maladies. Ces produits sont fabriqués et utilisés à large échelle, leur présence dangereuse comme contaminant dans l'environnement est bien connue. En effet, plusieurs rapports ont montré leur présence dans les effluents des usines de traitement des eaux usées [188]. Ils ont été détectés à faibles concentrations mais partout : sols et même parfois dans l'eau du robinet. Malgré leurs faibles concentrations, leur libération continue dans l'environnement les rend pseudo-résistants, d'où un risque toxique à long terme non seulement pour l'homme mais également pour les animaux et les végétaux [189].

Une fois dans l'environnement, les produits pharmaceutiques subissent des conversions qui peuvent induire la formation d'une grande variété de nouveaux composés : ils peuvent être métabolisés par des micro-organismes et/ou subir la photolyse, l'hydrolyse ou l'oxydation chimique. Ces modifications structurales peuvent conduire à la génération de nouveaux produits pouvant avoir une activité biologique similaire ou être plus actif et/ou plus toxique [190].

Les micro-organismes présentent des systèmes multienzymatiques leur permettant de métaboliser les xénobiotiques en une large gamme de produits transformés. Le métabolisme microbien des xénobiotiques est largement utilisé en tant que modèle pour les études de métabolismes mammaliens alors que les recherches sur le devenir des médicaments via le métabolisme microbien reste très peu répandu pour le moment [191].

En 2016, Olvera-Vargas et ses collègues [192] ont utilisé deux souches fongiques, *Aspergillus candidus* et *Cunning echinulata* pour étudier le devenir du furosémide (**figure 28**). Le furosémide (FRSM), diurétique très prescrit, a été détectée dans les environnements aquatiques. Il a également été reporté que cette molécule représentait un risque et des effets secondaires, hépatotoxicité et ototoxicité, chez certaines espèces.

De plus, son potentiel génotoxique et carcinogénique a aussi été mis en évidence [193]. Ces effets toxicologiques ont été associés à la formation de métabolites toxiques capables de perturber les fonctions cellulaires.

La biotransformation du FRSM par les deux endophytes a engendré trois nouvelles molécules : la saluamine (SLMN), un dérivé pyridinium (PRDN) et un autre produit, une hydroxy-cétone (HK) décrite pour la première fois.

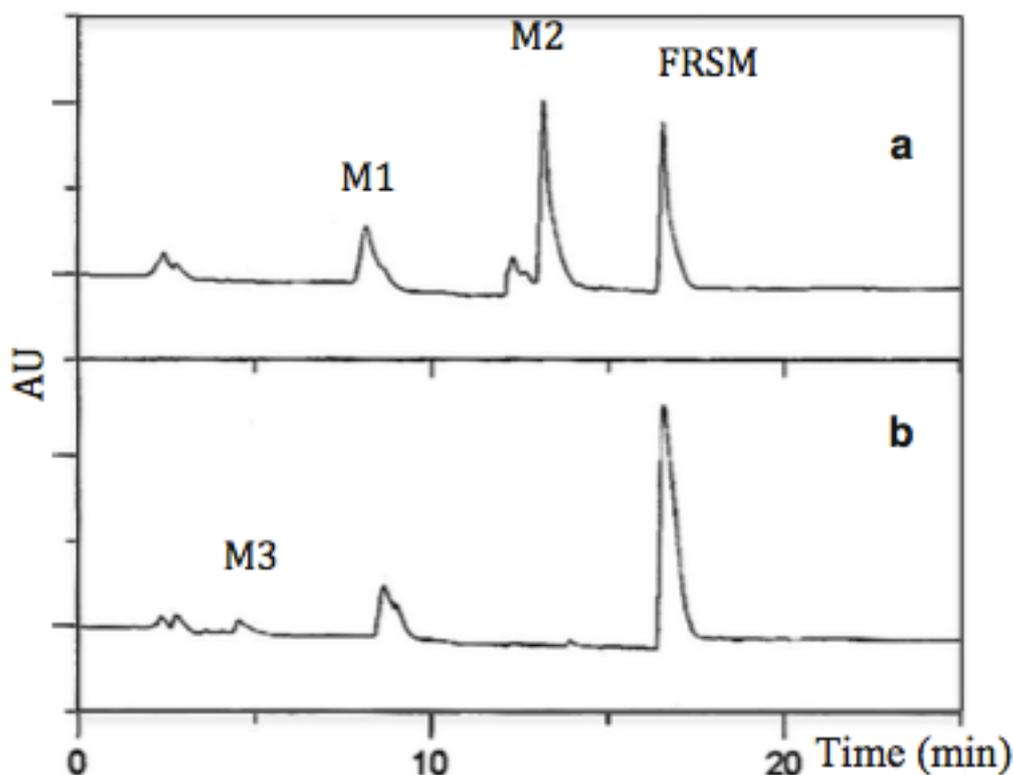


Figure 28 : chromatogrammes HPLC de la biotransformation du furosémide par (a) *C. echinulata* ATCC 9245 et par (b) *A. candidus* ATCC 20023 [192].

Par ces présents travaux, il a donc été confirmé que les deux champignons étaient capables de biotransformation en métabolisant le FRSM en trois composés principaux.

Malheureusement, les essais de toxicité, mesures de la diminution de la bioluminescence induite par le métabolisme cellulaire du FRSM entraînant la formation de nouvelles molécules et conduits avec la bactérie photoluminescente *V. fischeri*, ont mis en évidence la toxicité accrue des métabolites HK et PRDN par rapport à la molécule de départ.

Malgré la toxicité des métabolites engendrés, cette étude donne une perspective générale du devenir possible des médicaments et de leurs effets pernicieux dans l'environnement. Ces travaux de recherche peuvent également être utilisés en tant qu'outil pour le développement de stratégies de contrôle des eaux usées et de préservation de

l'environnement sans oublier l'évaluation des transformations biotiques de polluants d'origine médicamenteuse.

2.9 Conclusion

La plupart des réactions de biocatalyse peuvent être menées sous des conditions de sécurité, de santé, environnementales et économiques positives. Les biocatalyses confèrent une immense opportunité d'alternative viable dans la préparation de composés chiraux utiles dans la production médicamenteuse et d'arômes qui peuvent être considérés comme « naturels », concordant avec les préférences et les volontés mondiales de consommation [194] [173].

Par ailleurs, l'utilisation de cellules en tant que biocatalyseurs est considérée à l'unanimité comme étant une technologie moins polluante car « solvant – free ». Ainsi, les molécules obtenues via de tels procédés peuvent être estampillées « naturelles » et les composés oxygénés volatiles issus de ces cellules vivantes, dont les micro-organismes sont labellisés « GRAS », *Generally Regarded As Safe*, c'est - à - dire considérés comme sûrs [195].

De plus, les avantages de ces réactions par rapport aux réactions chimiques sont qu'elles sont régio- et stéréosélectives, qu'elles peuvent être menées à température ambiante et à pression atmosphérique [196].

Un autre avantage non négligeable de cette possibilité est la réduction d'étapes : cette synthèse microbienne peut se produire en une seule étape contrairement à certaines synthèses chimiques [186].

Les différentes classes d'enzymes peuvent catalyser de nombreux types de réactions chimiques entraînant une large variété de composés chiraux.

Enfin, l'intégration de la biocatalyse à la synthèse organique va susciter la création de nouvelles stratégies de synthèse et va ouvrir de nouvelles frontières technologiques d'intérêt fondamental ou pratique [162].

Malgré tous les avantages présentés par les transformations microbiennes, ces dernières conduisent généralement à des mélanges de produits étroitement apparentés étant donné que les métabolites peuvent être différents en fonction des étapes de réactions [196].

Dans de nombreux procédés, toutes les enzymes ne sont pas identifiées ce qui rend difficile la connaissance des enzymes impliquées dans les réactions et leur stéréospécificité.

2. Biotransformations réalisées par les endophytes des métabolites de la plante hôte

En considérant le fait que les endophytes sont en interaction continue avec leurs hôtes, il est logique de penser que les deux partenaires ont une influence sur leurs métabolismes respectifs. Ainsi, il a été suggéré que les métabolites secondaires jouent un rôle crucial dans les échanges entre endophytes et plantes hôtes, et spécialement pour des rôles de défense et de régulation de symbiose [197].

Afin de s'adapter à leur environnement écologique, les plantes ont développé de nombreux mécanismes de défense, comme la production d'une variété de métabolites secondaires toxiques, pour surmonter les pathologies microbiennes et lutter contre les herbivores. L'antibiose est une des stratégies de défense qui utilise les métabolites produits par la plante pour tuer ou inhiber la croissance de pathogènes notamment fongiques.

Ces molécules de défense peuvent être présentes de manière immuable, les phytoanticipines, dans la plante tandis que d'autres sont synthétisées *de novo* lors d'une attaque de pathogènes, les phytoalexines. La détoxification de ces composés de défense hautement bioactifs est une capacité largement étudiée de certains pathogènes entraînant notamment une résistance de ces derniers [161].

Cependant, depuis quelques années et devant l'intérêt croissant pour les endophytes, de nombreuses études se sont penchées sur leur relation particulière avec les plantes et leur capacité d'adaptation.

Les endophytes sont des micro-organismes possédant de puissants mécanismes d'adaptation nécessaires à la relation mutualiste qu'ils entretiennent avec leurs hôtes. En effet, ils présentent une grande tolérance vis-à-vis des métabolites secondaires dont certaines substances toxiques qui permettent la défense de la plante. Cette tolérance semble permise par leurs capacités de biotransformation. Comme évoquées précédemment, les biotransformations peuvent être définies comme une modification chimique d'une molécule par un système biologique. Cette modification peut inactiver le composé ou peut entraîner la production d'un métabolite actif à partir d'un précurseur inactif [198]. Cette activité de biotransformation par les endophytes peut avoir différents rôles de chimie écologique. Effectivement, ces réactions de bioconversions peuvent permettre une détoxification des métabolites toxiques de défense de la plante hôte envers les endophytes leur permettant ainsi de durablement s'établir.

Les capacités de bioconversions des endophytes, dans une certaine mesure, leur confèrent un certain avantage pouvant ainsi moduler la colonisation de leurs hôtes.

Contrairement à la symbiose mycorrhizienne qui est bien connue et documentée, la fonction précise des endophytes lors de leur interaction avec leurs hôtes est moins bien connue et comprise, leur rôle écologique reste encore sous exploré.

Afin de commencer à répondre à cette question, Tian & al. ont étudié l'interaction de *Paraconiothyrium variable* avec son hôte *Cephalotaxus harringtonia*. Dans cette étude, ils ont analysé l'impact fongique de l'endophyte sur la composition du métabolome de la plante et sur les effets rétroactifs sur la croissance fongique.

Une approche métabolomique associée à l'étude des biotransformations par les endophytes des composés isolés de la plante ont permis de montrer que trois métabolites parmi une centaine produits par la plante étaient spécifiquement métabolisés. Leurs structures chimiques ont été définies par des méthodes spectroscopiques et ont révélé qu'elles appartenaient à une série de flavonoïdes glycosylés [197]. Dans tous les cas, une déglycosylation significative a été observée menant à l'aglycone correspondant (**figure 29**).

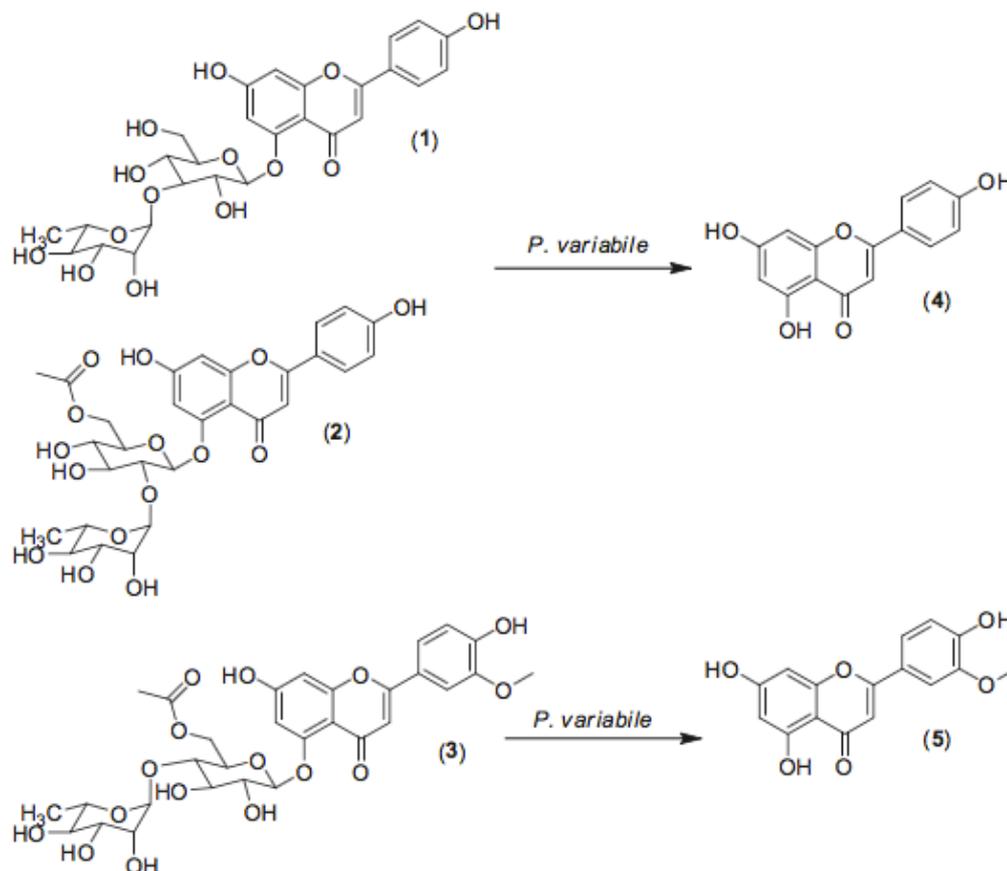


Figure 29 : biotransformations par *P. variable* des flavonoïdes glycosylés (1-3) isolées de l'extrait brut de *C. harringtonia* et structures aglycones obtenues (4,5)

Le résultat de cette réaction pourrait être une accumulation de flavonoïdes dans l'environnement de l'endophyte. Ces molécules sont connues pour être des molécules de signal dans la rhizosphère permettant l'activation de gènes de symbiose par stimulation de la germination de spores et de croissance mycélienne [199].

D'autres études ont rapporté que les flavonoïdes avaient un rôle dans la germination des propagules de certaines espèces fongiques comme *Fusarium solani* [200].

De plus, les flavonoïdes sont importants pour la pigmentation et la protection contre les UV. Ils servent comme signaux pour les pollinisateurs et d'autres organismes bénéfiques, participent à la signalisation hormonale et ont un rôle de phytoalexines. Ces molécules présentent des propriétés antibactériennes et antifongiques faisant ainsi partie de l'arsenal défensif produit par la plante hôte envers les pathogènes : les flavonoïdes sont biosynthétisés dans le cytoplasme et sont contenues dans des vacuoles sous forme glycosylée pour une meilleure stabilité et hydrosolubilité. Normalement, ces molécules ont besoin d'être libérées et déglycosylées pour devenir actives.

Ainsi, Tian & al. ont testé l'effet des composés 4 et 5 sur la croissance de *P. variable* et ont montré que contrairement aux formes 1 à 3 glycosylées, les molécules déglycosylées avaient un effet positif sur la croissance des hyphes (**figure 30**).

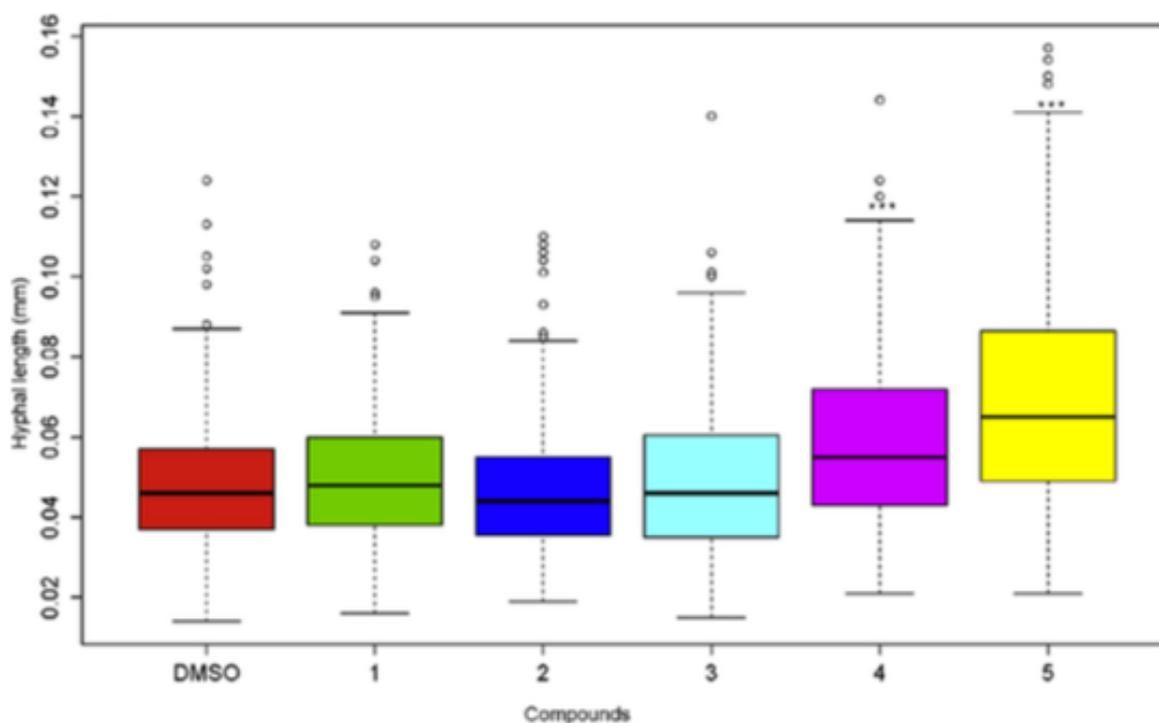


Figure 30 : longueurs des hyphes (mm) à partir des spores de *P. variable* en présence de flavonoïdes glycosylées (1-3) et des aglycones (4,5) après 24h et comparées au contrôle DMSO.

Les résultats suggèrent que l'endophyte *P. variable* induit une déglycosylation des flavonoïdes, impliquant probablement la sécrétion de glycosidases et ainsi promouvant sa propre croissance dans la plante hôte. Cette régulation positive de la croissance fongique pourrait de cette façon améliorer la colonisation de la plante par l'endophyte.

Un autre exemple est celui des benzoxazinones. Ces molécules constituent une classe unique de composés entrant dans la défense des plantes, les phytoanticipines, contre les nuisibles tels les champignons, les bactéries ou les insectes [201]. Dans les plantes du genre *Aphelandra*, les lactames 2-hydroxy-1,4-benzoxazin-3(2H)-one (HBOA) et 2-hydroxy-7-méthoxy-1,4-benzoxazin-3(2H)-one (HMBOA), les acides hydroxamiques 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIBOA) et les glucosides correspondants sont accumulés (**figure 31**).

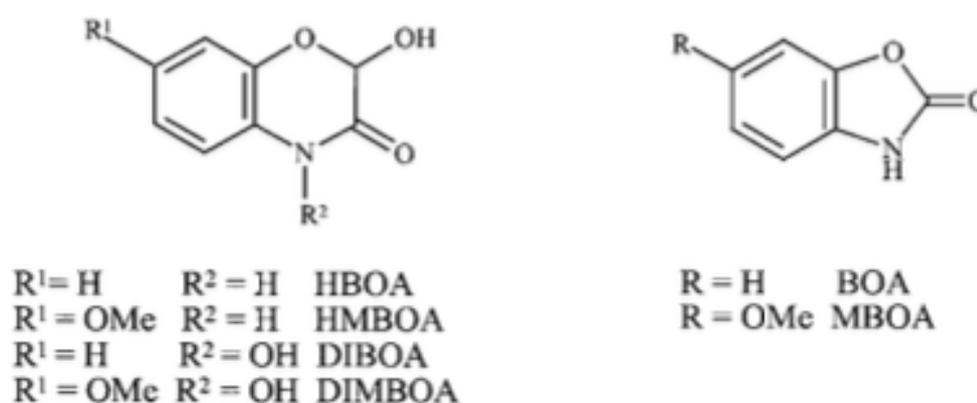


Figure 31 : structures des benzoxazinoïdes isolés à partir d'*Aphelandra* sp [202]

Lorsque l'intégrité cellulaire est rompue, une rapide déglycosylation survient entraînant la formation de molécules aglycones. Alors que les acides hydroxamiques sont chimiquement transformés en benzoxazolinone (2-benzoxazolinone, BOA, ou 6-méthoxybenzoxazolinone, MBOA) les lactames restent intacts en HBOA et HMBOA. Ainsi, les pathogènes envahisseurs, tout comme les endophytes, sont confrontés aux molécules toxiques que sont le BOA, le MBOA et les lactames moins toxiques HBOA et HMBOA.

Il a été montré que des pathogènes fongiques pouvaient détoxifier le BOA et le MBOA. Plus récemment, il a été montré qu'un endophyte fongique du maïs, *Fusarium moniliforme*, avait aussi la capacité de métaboliser ces molécules [203].

Dans leurs études, Zikmundova & al. ont isolé vingt quatre endophytes fongiques à partir d'*Aphelandra tetragona*. Parmi eux, ils ont sélectionné quatre endophytes pour continuer leurs essais : ces derniers ont métabolisé le BOA et le HBOA (**tableau 10**).

Tableau 10 : synthèse des biotransformations de BOA et HBOA par les isolats fongiques [202]

Compound	Metabolite(s) produced by:		
	<i>F. sambucinum</i>	<i>P. tabacinum</i> and <i>G. cibotii</i>	<i>Chaetosphaeria</i> sp.
BOA	6	None	None
HBOA	6	1, 2, 3, ^a 4, ^a 7, 8, 9, 10 ^b	1, 2, 7

Cependant, un seul, *Fusarium sambucicum*, s'est montré capable d'une telle biotransformation lui permettant une croissance mycélienne normale en présence de BOA (tableau 11) [202].

Tableau 11 : test de croissance mycélienne des cultures fongiques exposées à 1 mM de BOA et HBOA ainsi que leurs métabolites principaux issus de biotransformations par les endophytes [202].

Compound	% of inhibition relative to control (SD) for ^b :			
	<i>F. sambucinum</i>	<i>P. tabacinum</i>	<i>G. cibotii</i>	<i>Chaetosphaeria</i> sp.
BOA	0	30.7 (1.9)	32.5 (1.8)	27.3 (3.0)
HBOA	0	18.9 (2.0)	9.2 (1.0)	11.3 (1.5)
Metabolite 1	— ^c	10.5 (2.2)	6.5 (1.5)	6.6 (1.6)
Metabolite 2	—	10.8 (1.4)	1.2 (1.8)	4.4 (1.2)

Le BOA est le produit de la dégradation spontanée du DIBOA, composé final entrant dans la défense de la plante contre un parasite. La culture des quatre endophytes fongiques en présence de cette molécule n'a pas montré de dégradation de matériel fongique et ce, même après un long temps d'incubation (24 jours).

De plus, *F. sambucinum* a totalement métabolisé le BOA en acide N-(2-hydroxyphényl) malonique en 14 jours, composé déjà connu comme étant un produit de dégradation du BOA par des pathogènes fongiques du maïs [203].

F. sambucinum a également été le seul endophyte à ne pas avoir vu sa croissance inhibée par le BOA. L'incapacité de croissance normale des autres endophytes en présence de cette molécule correspond à l'incapacité de détoxification cette molécule.

Le genre *Vanilla* appartient à la famille des Orchidées et comprend environ une centaine d'espèces dont *Vanilla planifolia*, source naturelle la plus importante du même arôme très subtil mais complexe. Si des études ont déjà été menées sur la flore fongique de la vanille, celles-ci ne se sont jusque là concentrées que sur les mycorhizes. Comme pour de nombreuses autres plantes, les colonies d'endophytes n'ont jamais été étudiées pour la vanille de l'île de la Réunion. Les amateurs de vin connaissent bien *Botrytis cinerea*, ce champignon qui se développe sur les grains de raisin. Responsable de la « pourriture noble », il confère au vin blanc éponyme son caractère liquoreux tant apprécié [161]. A l'instar de *Botrytis cinerea*, pour le raisin, les endophytes fongiques des gousses de vanille pourraient-ils jouer un rôle dans le développement de leur bouquet aromatique ? Pour répondre à cette question, dans leur étude, Khoyratty & al. ont essayé d'établir le rôle des endophytes présents dans les gousses de vanille, qu'ils ont caractérisés, dans le développement de l'arôme de vanille. Les chercheurs ont mis en culture, sur un milieu contenant du matériel lyophilisé et autoclavé de gousse verte, vingt endophytes fongiques, tous isolés à partir des gousses vertes de vanille malgré les propriétés antimicrobiennes de *V. planifolia* [204].

Après 30 jours d'incubation, la concentration en composés aromatiques de chacun des échantillons a été mesurée puis comparée aux résultats obtenus pour le témoin indemne de toute colonisation fongique. Sur les 20 souches fongiques testés, deux seulement, *Diaporthe phaseolorum* et *Pestalotiopsis microspora* ont montré des augmentations de taux de métabolites aromatiques détectés. Dans les milieux de culture de ces endophytes fongiques, les taux de vanilline, de p-hydroxybenzaldéhyde et d'alcool vanillique ont significativement augmenté en comparaison au témoin. Ces trois molécules sont connues pour jouer un rôle essentiel dans le bouquet aromatique de la vanille [205]. Cependant, les chercheurs restent prudents quant aux conclusions à tirer et suggèrent la participation possible des endophytes fongiques à l'élaboration du bouquet aromatique de la vanille.

Un dernier exemple des biotransformations réalisées par les endophytes des métabolites secondaires de leurs hôtes est l'exemple de biotransformations de l'huile essentielle d'*Eupatorium buniifolium*. Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de composés de bas poids moléculaire issus du métabolisme secondaire des plantes, véritable témoin de l'empreinte végétale. Ces huiles essentielles sont bien connues pour leur bioactivité et notamment leurs propriétés antimicrobiennes.

L'intérêt porté aux huiles essentielles ces dernières années a fortement augmenté et dans de nombreux domaines : en agriculture, dans les industries pharmaceutique, cosmétique

et agroalimentaire. Cet intérêt croissant du consommateur pour des produits plus naturels et/ou plus écoresponsables rend les sources naturelles d’approvisionnement insuffisantes pour couvrir la forte demande. Ainsi, il est indispensable de développer de nouvelles techniques de production de ces composés grâce à des ressources naturelles abondantes et renouvelables.

La biocatalyse est un instrument naturel approprié pour la transformation de produits naturels. Cette technologie n’est pas simplement plus écologique mais également mieux acceptée par la société.

Pour leurs biotransformations, les huiles essentielles limitent cependant l’utilisation de systèmes microbiens dans leur intégralité du fait de leurs propriétés antimicrobiennes. Peu d’études ont été menées jusqu’à présent traitant la possibilité du vivre-ensemble des endophytes avec leurs hôtes.

Pourtant, en 2017, dans leurs études, Cecati & al. ont étudié la capacité de biotransformation des endophytes isolés à partir d’*Eupatoium buniifolium*, plante endémique d’Argentine de la famille des Astéracées utilisée en médecine traditionnelle pour leurs activités antimicrobiennes, anti-malarique et anti-inflammatoires notamment.

Les chercheurs se sont basés sur l’hypothèse selon laquelle les endophytes possédaient la capacité de survivre en présence d’huile essentielle de la plante hôte grâce au développement des compétences de biotransformations des principaux composés antimicrobiens comme l’ α -pinène, le sabinène et le R-(+)-limonène, ubiquitaires et présents en grande quantité dans les huiles essentielles de différentes plantes et leur disponibilité en tant que composés purs (figure 32).

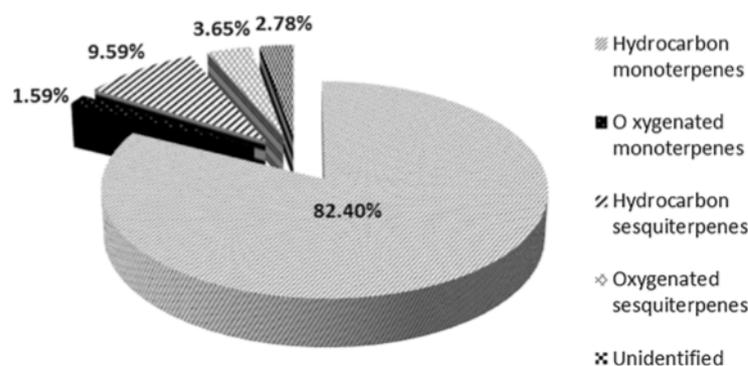


Figure 32 : pourcentage des différents groupes de composés chimiques de l’huile essentielle d’*Eupatoium buniifolium* obtenue par hydrodistillation. Les composés ont été caractérisés par GC-MS et quantifiés par GC-FID [206].

Pour les essais de biotransformations, ils ont sélectionné quatre endophytes fongiques et une levure. Parmi ces micro-organismes, trois champignons, *Fusarium solani* (Eb01), *Alternaria alternata* (Eb03) et *Neofusicoccum* sp. (Eb04), ont été capables de métaboliser les trois différents substrats en concentrations différentes (0,25 et 0,125% V/V) [206] (**figure 33**).

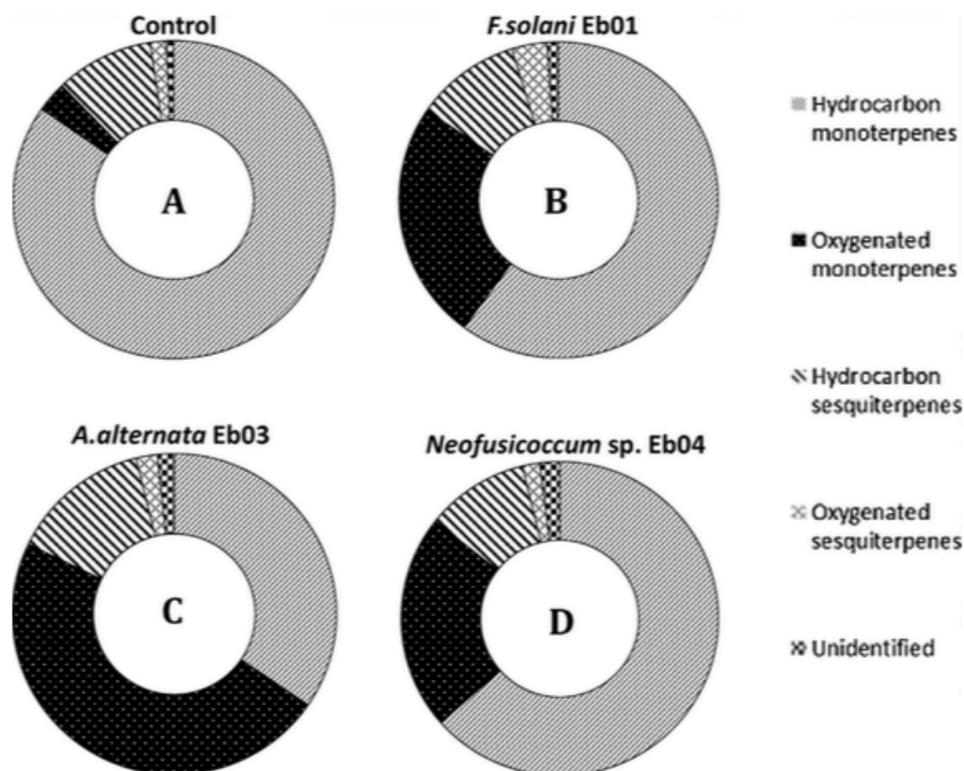


Figure 33 : comparaison des différents pourcentages des différents groupes chimiques de (A) l'huile essentielle d'*Eupatorium buniifolium* incubée avec (B) *F. solani* Eb01, (C) *A. alternata* (Eb03) et (D) *Neofusicoccum* sp. Eb04 [206].

Les trois souches différentes sont donc bien capables de métaboliser les composés de l'huile essentielle et donnent des produits nouveaux de biotransformations dans différentes proportions. En effet, *A. alternata* et l'endophyte qui biotransforme le plus les monoterpènes hydrocarbonés en monoterpènes oxygénés (**figures 34, 35 et 36**).

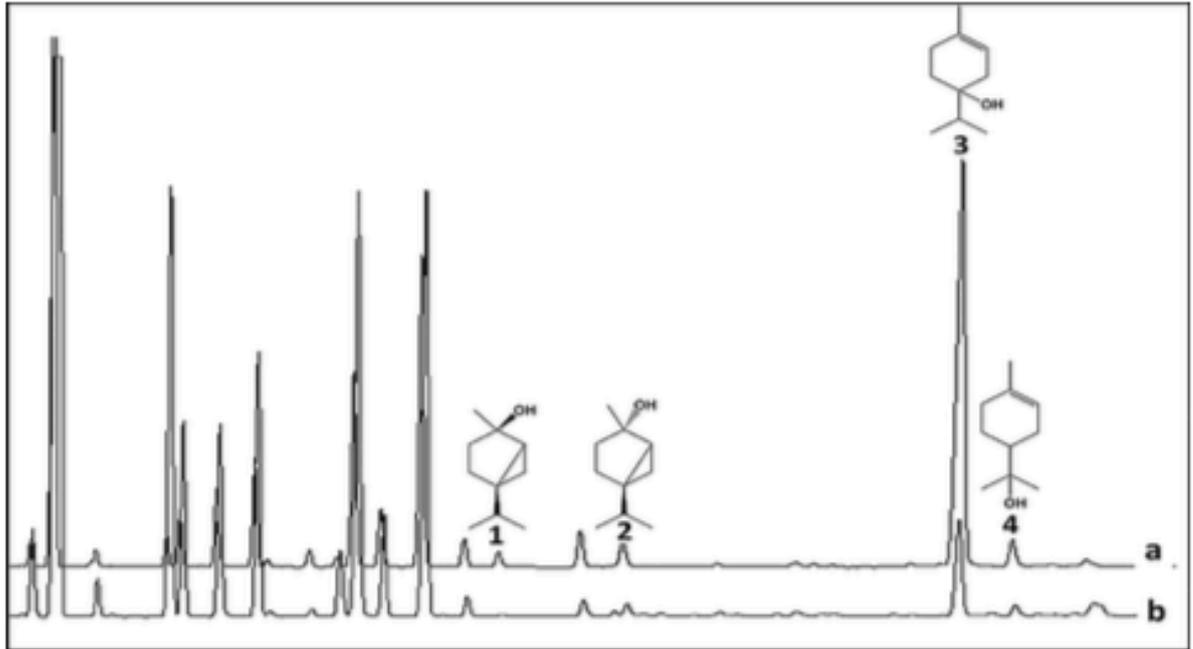


Figure 34 : comparaison entre les profils GC – FID de l’huile essentielle d’*Eupatorium buniifolium* (b) et de sa biotransformation par *F. solani* Eb01 (1 : cis-sabinène hydrate, 2 : trans-sabinène hydrate, 3 : terpinèn-4-ol, 4 : α-terpinéol) [206]

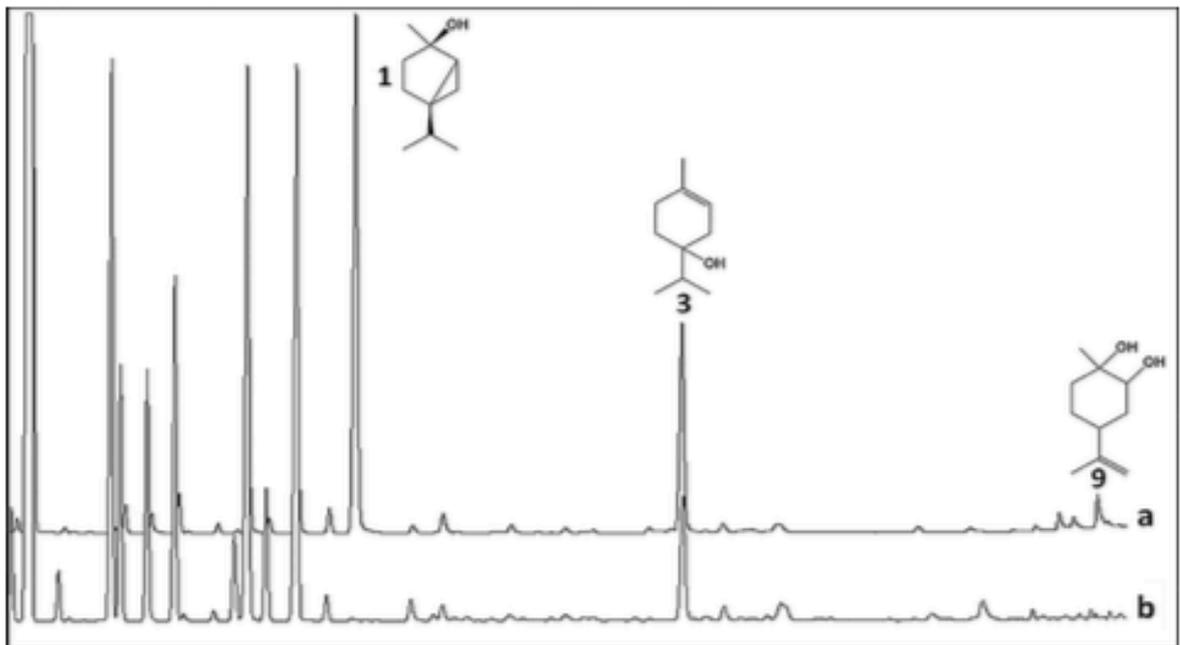


Figure 35 : comparaison entre les profils GC – FID de l’huile essentielle d’*Eupatorium buniifolium* (b) et de sa biotransformation par *A. alternata* Eb03 (1 : cis-sabinène hydrate, 3 : terpinèn-4-ol, 9 : limonèn-1,2-diol) [206]

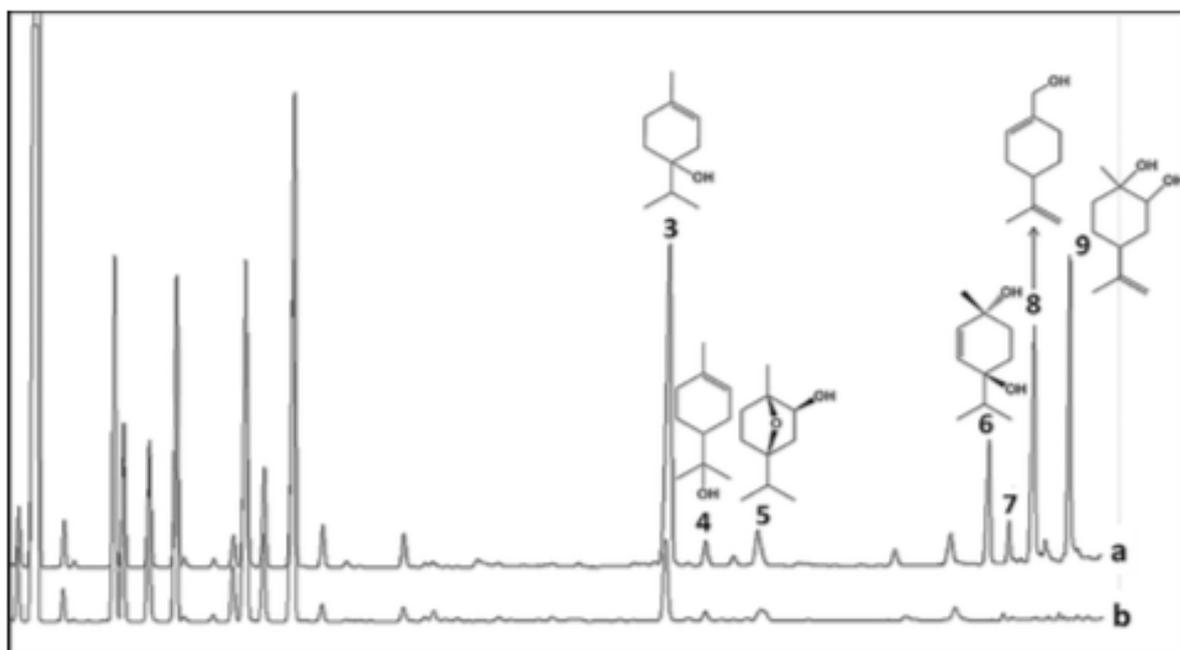


Figure 36 : comparaison entre les profils GC – FID de l’huile essentielle d’*Eupatorium buniifolium* (b) et de sa biotransformation par Eb04 (3 : terpinèn-4-ol, 4 : α -terpinéol, 5 : 2- β -hydroxy-1,4-cinéol, 6 : ascaridol glycol, 9 : limonèn-1,2-diol) [206]

3. Conclusion

Les réactions de biotransformations sont réalisées par de nombreux micro-organismes, bactéries, champignons, et peuvent avoir de nombreuses applications industrielles variées.

Les endophytes, très étudiés d’un point de vue de leur production de métabolites secondaires initialement isolés de la plante jouent également un rôle très important dans la vie et la physiologie de son hôte.

La plupart des réactions de bioconversions sont réalisées *in vitro*, dans des conditions contrôlées et standardisées, une extrapolation peut seulement être faite concernant leur rôle s’il y a, *in planta*. A ce jour, quelques études seulement ont été faites *in vivo*, études sur la conséquence de l’association plante – endophytes sur l’écosystème local et la mesure des alcaloïdes produits par les endophytes dans la plante comme mécanisme de défense contre les herbivores et les pathogènes [105] [207].

Dans des conditions de laboratoires, la culture d’endophytes fongiques peut entraîner à des modifications profondes de leur métabolisme. Le challenge sera de mimer les conditions naturelles *in planta* et de prendre en compte toutes les interactions, avec les autres endophytes, les pathogènes, les autres espèces végétales, afin de lever le voile sur les fonctions et les

mécanismes de régulation existants. Ce défi est un défi pluridisciplinaire nécessitant la chimie des produits naturels tout comme la biochimie, l'écologie chimique ou encore l'écologie environnementale.

PARTIE IV : *Helichrysum italicum*, diversité des micro-organismes endophytes et biotransformations

Les relations plantes – endophytes sont des relations symbiotiques dans lesquelles les deux parties tirent des bénéfices. En effet, les endophytes apportent à leurs hôtes une défense supplémentaire via la production de métabolites secondaires vis-à-vis des nuisibles, une meilleure assimilation des nutriments ainsi qu'une promotion de la croissance végétale. En contre partie, les endophytes sont abrités et disposent de la protection de l'hôte, et d'un avantage de colonisation par rapport aux autres micro-organismes parasites qui eux, activent les défenses de la plante.

Pour se défendre les plantes utilisent différentes stratégies : elles peuvent synthétiser un arsenal de métabolites secondaires jouant notamment un rôle d'antibiose. La question qui peut alors se poser est : comment les endophytes, micro-organismes vivant à l'intérieur des tissus végétaux, sont capables de vivre de façon pérenne et en symbiose avec leurs hôtes malgré ces puissants systèmes de défense rendant cet environnement hostile et non propice à une croissance microbienne ? Malgré une écologie de ces interactions encore mal connue, l'hypothèse serait que les micro-organismes endophytes se sont adaptés et ont su développer des réactions de métabolisation, de biotransformations des métabolites secondaires toxiques de la plante les rendant ainsi moins nocifs. Cette adaptation, cette capacité de détoxification leur aurait donc permis un avantage d'écologie chimique par rapport aux autres micro-organismes pour se développer à l'intérieur de l'hôte en court-circuitant son système de défense.

L'immortelle d'Italie, très étudiée d'un point de vue du chémotype de son huile essentielle, n'a jamais été étudiée d'un point de vue interactions plante – micro-organismes.

Les travaux réalisés lors du stage entre l'unité des Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes, équipe de Chimie des Produits Naturels et Fongiques (CPNF) du Muséum National d'Histoire Naturelle à Paris et le laboratoire de Chimie des Produits Naturels de l'Université de Corse à Corte ont donc porté sur l'Immortelle de Corse et ses endophytes.

En effet, l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* est une huile essentielle riche en β -1,3-dicétones. Ces molécules sont des molécules difficiles à réduire chimiquement. Etant

donné que les plantes abritent de nombreux organismes, l'Immortelle d'Italie ne déroge pas cette règle et vit elle aussi en symbiose avec des micro-organismes dont des endophytes.

Le point de départ de ces travaux était donc de savoir si ces micro-organismes endophytes étaient capables d'une telle réaction de réduction. A partir de là, le travail a été étendu à l'étude des endophytes présents dans la plante et à leur caractérisation, aux cultures fongiques, dans un souci d'optimisation des conditions de culture et de viabilité de la croissance fongique en présence de l'huile essentielle d'Immortelle. Effectivement, les huiles essentielles sont connues pour avoir des propriétés antimicrobiennes et antifongiques. Dans un tel environnement, la question de la survie et du développement des micro-organismes se pose. Les biotransformations réalisées par les endophytes pourraient en être la réponse.

Pour essayer de répondre à toutes cette question, différentes étapes ont rythmé la réflexion : une première étape microbiologique, puis une étape plutôt axée vers la chimie avec les bioconversions et enfin une étape visant à étudier les interactions plantes – endophytes possibles.

I. Matériels et méthodes

1. Endophytes : isolement et caractérisation

1.1. Récolte et isolement des endophytes à partir d'*Helichrysum italicum*

L'immortelle utilisée pour l'isolement de ses endophytes a été récoltée deux fois en Corse à 6 mois d'intervalle. Les échantillons de l'étude préliminaire ont été récoltés en juillet 2016 à Poggio Di Venaco en Haute Corse (2B) par Didier BUISSON et Julien PAOLINI. La deuxième récolte a été faite au mois de février 2017 sur le même site par Julien PAOLINI.

Les échantillons de la deuxième récolte (feuilles seulement) ont été nettoyés par trempage dans de l'eau permutée pendant 15 secondes, puis immergés dans de l'éthanol à 70° pendant 15 secondes, puis dans de l'eau de javel pendant 15 secondes et enfin dans de l'eau permutée pendant 15 secondes.

De petits fragments de feuilles stérilisées et coupées ont été déposés sur boîte de pétri contenant du milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (**figure 37 a**). La culture de ces endophytes s'est faite dans une salle de culture à 25-28°C pendant une semaine.

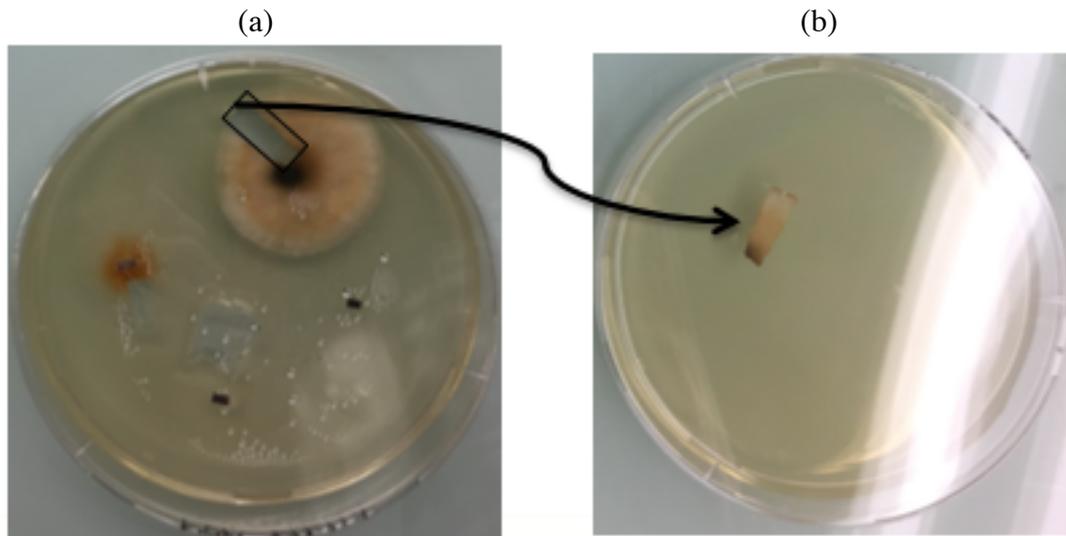


Figure 37 : (a) boîte de pétri (90x15mm) contenant du PDA sur laquelle ont été déposés 4 fragments de feuilles d'Immortelle stérilisées, (b) purification des endophytes isolés à partir de feuilles d'Immortelle.

A partir de ces cultures, les endophytes purs ont été séparés et isolés sur de nouvelles boîtes de pétri contenant du PDA (**figure 37 b**) de façon à pouvoir dans un second temps les caractériser.

1.2. Caractérisation des endophytes

1.1 Extraction de l'ADN fongique

Pour caractériser les 13 endophytes isolés à partir d'Immortelle, le protocole d'extraction de l'ADN génomique total de champignon microscopique avec le kit QIAGEN DNeasy Plant mini (Qiagen, Hilden, Allemagne), fourni par le fabricant, a été suivi. L'ADN a été extrait à partir de mycélium obtenu en réalisant des cultures sur du milieu MEA (Malt Extract Agar) pendant 2 à 4 jours à 25°C.

1.2 PCR

Avant de séquencer tous les isolats, les endophytes ont été observés de manière macroscopique afin d'établir des ressemblances pour ne pas séquencer plusieurs fois les mêmes. Ainsi, HI 4 et HI 6 se ressemblant beaucoup, seulement HI 6 a été soumis au séquençage. De la même façon, HI 5 se rapprochant de HI 2 n'a pas été séquençé.

Pour toutes les souches, exceptée HI 6, l'ADN ribosomal de la région ITS (Internal Transcribed Spacer), incluant le gène ARNr 5,8S, a été amplifié (**tableau 12 et figure 38**).

La région ITS est considérée comme la région de référence par les taxonomistes pour l'identification des espèces fongiques [208]. En effet, une partie de cette région est très conservée chez la majorité des espèces fongiques et une partie de cette région présente une variabilité pouvant être utilisée pour la phylogénie des champignons [209][210]. Pour la souche HI 6 (ressemblant à un *Penicillium*), la région de la β -Tubuline a été amplifiée (**tableau 12**). Les séquences de cette région sont riches en introns où le taux de variabilité semble approprié pour une bonne discrimination au sein de genre conservés tels que les *Penicillium* [211].

Une fois l'étape de l'extraction de l'ADN fongique terminée, les échantillons sont préparés en vue de réaliser la PCR, technique d'amplification d'ADN in vitro. Le mélange des différents réactifs de la PCR est appelé « Master Mix » ou « mélange réactionnel » auquel l'échantillon d'ADN à amplifier est ajouté.

Le mélange réactionnel est composé de 2,5 μ l de tampon MgCl₂, 1 μ l de dNTP (Eurogentec, Seraing, Belgique) à 5mM, 1 μ l d'amorces à 10mM ITS4 et ITS5 pour les isolats HI 2, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 et 1 μ l à 10mM d'amorces Tubuline pour HI 6, 7,875 μ l d'eau et 0,125 μ L à 5 unités de Taq polymérase (Q-BIOgene, Illkirch, France). Enfin, 12,5 μ l de dilution d'ADN sont ajoutés au « Master mix ».

Tableau 12 : amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage

Locus	Amorces	Direction	Séquences	Références
ITS	ITS 4	Anti-sens	TCCTCCGCTTATTGATATGC	[209]
	ITS 5	Sens	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	
β -Tubuline		Sens	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	[212]

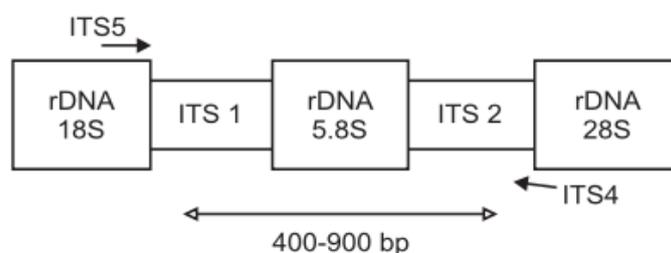


Figure 38 : diagramme schématique d'un cluster de gènes d'ADNr fongique. Les gènes codant les sous unités d'ARN ribosomique 18S, 5,8S et 28S sont séparés par les espaces internes transcrits 1 (ITS1) et (ITS2) épissés après transcription. Les amorces ITS4 et ITS5 (flèches simples) ont été utilisées pour amplifier les ADNr de tous les champignons, produisant un fragment spécifique par espèce allant de 400 à 900 pb (double flèche) [213].

Les échantillons d'ADN sont alors amplifiés par PCR à l'aide de Thermocycler T100™. Le programme d'amplification est composé d'une phase de chauffage allant jusqu'à 94°C pendant 4 minutes puis d'un cycle composé d'une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une phase d'hybridation à 55°C pendant 30 secondes et d'une phase d'élongation à 72°C pendant 40 secondes (**figure 39**). Ce cycle est répété 30 fois et se termine par une élongation finale à 72°C pendant 10 minutes. Enfin, il y a une phase de refroidissement jusqu'à 25°C.

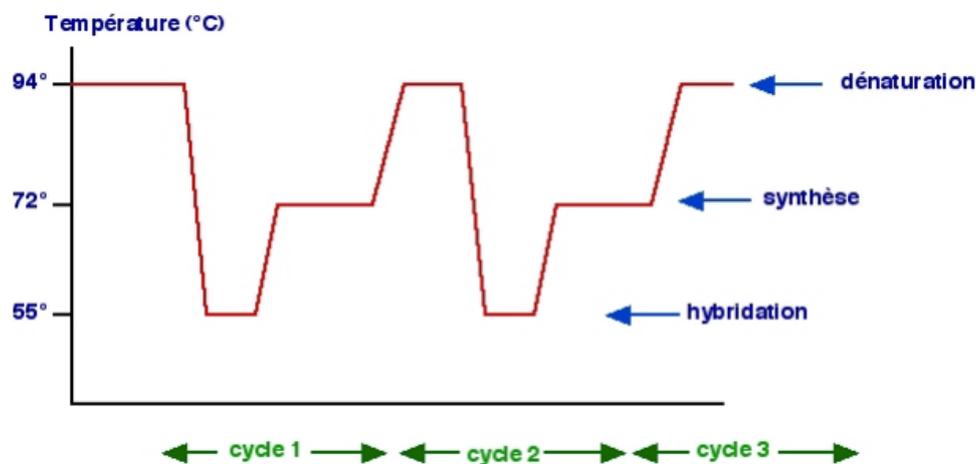


Figure 39 : Etapes de la PCR et cycles thermiques [214].

Une fois la PCR terminée, une électrophorèse sur gel d'agarose a été réalisée pour les produits de la réaction afin de vérifier leur qualité.

2. Cultures fongiques

2.1. Etudes des conditions de culture des micro-organismes endophytes

2.1.1. Optimisation des milieux de culture des endophytes

Dans cette partie, des milieux différents de culture ont été testés afin de sélectionner et standardiser des milieux optimaux pour une bonne croissance mycélienne en vue d'obtenir une biomasse correcte pour les essais de biotransformations mais également de façon à conserver les traits morphologiques, physiologiques et génétiques des souches fongiques.

Le premier milieu testé, le PDA, est un milieu standard utilisé en routine au service commun de mycologie du laboratoire MCAM. Le deuxième est un milieu plus concentré de

10% en PDA dans lequel un extrait aqueux de feuilles d'Immortelle a été ajouté (10% du volume final). Un troisième milieu testé est un milieu de MEA et le dernier est un milieu plus concentré en MEA de 10% dans lequel un extrait aqueux de feuilles d'Immortelle a été ajouté.

Pour préparer le bouillon d'Immortelle, 43,98g de feuilles d'Immortelle sont broyées dans un mortier avec de l'azote liquide et un pilon. Une poudre grossière est obtenue et placée dans un flacon auquel on ajoute 200ml d'eau permutée. La suspension est mise au micro-ondes pendant 5 minutes de façon à ce que la mixture bout. Le mélange est filtré. La « pâte » est récupérée à laquelle le protocole est une nouvelle fois appliqué. Le volume total de l'extrait aqueux de feuilles d'Immortelle est de 420ml séparé en deux flacons de 200ml pour une meilleure conservation et éviter un développement bactérien après autoclave.

2.2 Etude préliminaire de l'activité antifongique de l'huile essentielle

Dans cette partie, la question de la sensibilité des endophytes à l'huile essentielle d'Immortelle s'est posée. Afin de tester et d'évaluer la toxicité de l'huile essentielle envers les endophytes de la plante, la méthode des microatmosphères a été réalisée. Cette méthode permet d'évaluer la croissance mycélienne.

Dans cette technique, une boîte de pétri de 5 cm de diamètre contenant 10 ml de milieu gélosé PDA est d'abordensemencée par un fragment de 0,5 cm de diamètre prélevé à la périphérie de différentes cultures fongiques (HI 8 – 12 – 13 – 15 – 16 – 17) dans du milieu PDA; puis un disque de papier Wattman imbibé d'une quantité d'huile essentielle pure ($V = 2,5 ; 5 ; 10 \mu\text{l}$) est déposé au centre du couvercle de la boîte de pétri. La culture est ensuite placée dans la salle de culture (illuminée de 8h à 20h), couvercle en bas, pendant 7 jours à 25° - 28°C. Un témoin, dépourvu d'huile essentielle, est également préparé. Après 7 jours de culture, les diamètres d'inhibition sont mesurés afin de calculer le pourcentage d'inhibition grâce à la formule suivante :

$\% \text{ d'inhibition} = \frac{D_0 - D_c}{D_0} \times 100$, D_0 étant la croissance diamétrale du témoin et D_c la croissance du champignon en présence de l'huile essentielle.

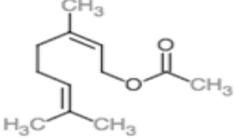
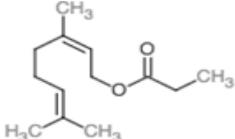
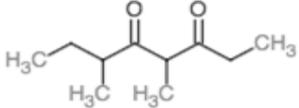
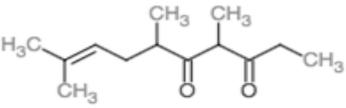
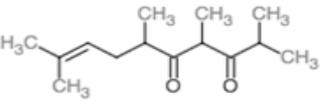
3. Bioconversions des composés isolés de l'huile essentielle par les endophytes

Dans cette partie, l'activité des micro-organismes endophytes de l'Immortelle vis-à-vis des composants de l'huile essentielle d'Immortelle est étudiée.

L'huile essentielle commerciale d'Immortelle de Corse utilisée pour ces expériences a été achetée auprès de la distillerie Astratella en Balagne. Elle a été fractionnée à l'aide d'une Flash Chromatographie, modèle CombiFlash® RF Teledyne ISCO.

Deux fractions (F4 et F9) de l'huile essentielle ont particulièrement attiré notre attention : la fraction contenant l'acétate de néryle et celle contenant les β -dicétones (**tableau 13**).

Tableau 13 : composition des fractions de l'huile essentielle d'Immortelle

Fractions	Composés majoritaires contenus dans les fractions	Structures	% relatif
F4	Acétate de néryle		94,1
	Propionate de néryle		2,6
F9	4,6-diméthyl-octan-3,5-dione		7,4
	4,6,9-triméthyl-déc-8-èn-3,5-dione		48,9
	2,4,6,9-tétraméthyl-déc-8-ène-3,5-dione		30,1

Pour l'étude des bioconversions, des cultures d'endophytes sont lancées à JO dans 50 ml d'YMS glucosé à 25-28°C pendant 60 heures sous agitation (145 rotation per minute (rpm)). Les biomasses sont récoltées, filtrées et séparées en X lots de masses égales.

Ces biomasses (environ 5g) sont remises en suspension dans un tampon citrate phosphate afin de pouvoir contrôler le pH (pH = 7, à 0,5M V=10ml) ; puis sont ajoutées 50 μ l d'huile

essentielle d'immortelle ou 20 μ l d'une fraction. Les biotransformations sont réalisées dans la salle de culture à 25-28°C à 145 rpm.

Durant les 3 jours suivants l'ajout de substrat, des prélèvements de 1ml sont mis dans un épandorf de 1,5ml auquel 300 μ l d'AcOEt sont ajoutés. Les échantillons sont vortexés (1 min), soniqués (20 min) et centrifugés (5 min à 13000rpm).

Chaque jour et pour chaque prélèvement, le pH est contrôlé. Le 4^{ème} et dernier jour de l'étude de la biotransformation, l'extraction est effectuée sur la totalité de l'échantillon. La suspension est transférée dans un Falcon de 15 ml au lequel on ajoute 1 ml d'AcOEt.

Comme pour les jours précédents, les prélèvements sont vortexés, soniqués et centrifugés à 4000rpm pendant 20 à 30 minutes.

Les prélèvements sont analysés en chromatographie en phase gazeuse avec un chromatographe Perkin-Elmer Autosystem Clarus 600 équipé de deux détecteurs à ionisation de flamme (FID) un injecteur diviseur et 2 colonnes de silice (60m x 0,25mm d.i., épaisseur du film : 0,25 μ m), dont une polaire (Rtx-Wax, polyéthylèneglycol) et une apolaire (Rtx-1, polydiméthyl-siloxane).

La température du four est programmée de 80°C à 230°C avec un gradient de 2°C/min et maintenu à 230°C pendant 20 min. Les températures d'injection et de détection sont maintenues à 250°C.

Les échantillons ont été injectés en mode split en utilisant l'hydrogène comme gaz vecteur (1ml/min) avec une pression en tête de colonne de 25 p.s.i..

Les quantités injectées sont de 5 μ l pour les extraits d'isolats et extrait aqueux de feuilles d'Immortelle, 0,4 μ l pour les huiles essentielles et 0,2 μ l pour les échantillons de biotransformations des différentes fractions.

Les analyses GC-MS ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin-Elmer Autosystem XL (modèle SQ8C) possédant un injecteur automatique et 2 colonnes (60m x 0,25mm d.i., épaisseur du film : 0,25 μ m) avec un polaire (Rtx-Wax) et apolaire (Rtx-1) couplé à un détecteur quadripolaire Perkin-Elmer TurboMass opérant dans les mêmes conditions chromatographiques que précédemment.

L'acquisition des données chromatographiques est réalisée en mode SCAN: intervalle de masse 35-500 uma avec un délai de 1 seconde entre deux scans, température de la source 200°C.

Les spectres de masse ont été enregistrés sous impact électronique (IE) avec un voltage d'ionisation à 70 eV. L'appareil est géré par un système informatique muni d'une bibliothèque de spectres de masse et d'indices de rétention propre au laboratoire et de banques commerciales (ADAMS, KOENIG) spécifiques aux composés des huiles essentielles.

Pour identifier les composés, une comparaison est réalisée entre les spectres de masses et les indices de rétention (colonnes polaire et apolaire) obtenus pour les constituants du mélange et ceux contenus dans la banque de données du laboratoire.

II. Résultats et discussions

1. Endophytes : séquençage

Le séquençage de l'ADN a été sous traité par la société Genoscreen à Lille. Les séquences obtenues ont été comparées avec celles de la banque de données NCBI GenBank en utilisant la méthode de recherche BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) du logiciel d'alignement des séquences MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) afin de trouver des régions ayant des zones de similitude entre deux ou plusieurs séquences (**tableau 14**).

Tableau 14 : résultats du séquençage d'ADN des endophytes isolés

Isolats	Plante	Amorces	Numéro d'accession NCBI	Correspondance base de données NCBI	% correspondance
HI 2	<i>H. italicum</i>	ITS 4 ITS 5	KY609180	<i>Alternaria alternata</i>	100
HI 4	<i>H. italicum</i>	β -tubuline		<i>Penicillium murcarium</i>	
HI 5	<i>H. italicum</i>	ITS 4 ITS 5		<i>Alternaria alternata</i>	
HI 6	<i>H. italicum</i>	β -tubuline	KP016924	<i>Penicillium murcarium</i>	100
HI 7	<i>H. italicum</i>	ITS 4 ITS 5	KY609180	<i>Alternaria alternata</i>	100
HI 8	<i>H. italicum</i>	ITS 4 ITS 5	EU552163	<i>Truncatella helichrysi</i>	99
HI 9	<i>H. italicum</i>	ITS 4 ITS 5	EU167565	<i>Didymella pinodella</i>	99
HI 10	<i>H. italicum</i>	ITS 4 ITS 5	EU167565	<i>Didymella pinodella</i>	99
HI 11	<i>H. italicum</i>	ITS 4 ITS 5		<i>Podospora glutinans</i>	
HI 12	<i>H. italicum</i>	ITS 4 ITS 5	EU167608	<i>Kabatellia microstica</i>	100
HI 13	<i>H. italicum</i>	ITS 4 ITS 5	HM123371	<i>Nemania serpens</i>	99
HI 14	<i>H. italicum</i>	ITS 4 ITS 5	EU167565	<i>Didymella pinodella</i>	99
HI 15	<i>H. italicum</i>	ITS 4 ITS 5	EU167565	<i>Didymella pinodella</i>	99
HI 16	<i>H. italicum</i>	ITS 4 ITS 5	HM123358	<i>Podospora glutinans</i>	96
HI 17	<i>H. italicum</i>	ITS 4 ITS 5	KF144895	<i>Arthrinium kogelbergense</i>	96

Même si certaines caractérisations ont été faciles et évidentes de manière macroscopique, plusieurs souches ont été reconnues comme identiques entre elles (notamment HI 2, HI 5 et HI7 identiques entre elles mais aussi HI 4 ET HI 6 similaires entre elles et HI 11 avec HI 16).

En revanche, certains endophytes isolés se sont avérés plus compliqués à déterminer après séquençage, voire impossibles du fait d'un pourcentage de similarité des séquences trop bas (**tableau 14**). En effet, les pourcentages de similarité sont déterminés entre les séquences isolées au cours de l'étude et les séquences les plus proches répertoriées dans GenBank. Ces séquences ne sont considérées comme similaires que lorsqu'elles ont un pourcentage d'homologie au moins égal à 97,5%.

Toutes les souches à l'exception de HI 16 et HI 17 ont été déterminées de façon précise (pourcentage de correspondance supérieur ou égal à 99%). Ces deux dernières ont des taux de recouvrement plutôt bas (96%), on ne peut donc pas conclure quant à leur caractérisation. Cette dernière serait à approfondir notamment pour déterminer l'espèce.

Trois de ces souches isolées semblent avoir un plus grand intérêt car ce sont des endophytes vrais : HI 8 (*Truncatella helichrysi*), HI 13 (*Nemania serpens*) et HI 17, avec un faible pourcentage de recouvrement (96%), appartiendrait à la famille des *Arthrinium* mais d'espèce inconnue.

Peu d'articles font référence à ces trois derniers endophytes. Pourtant, *Truncatella helichrysi*, a été isolé de *Foeniculum vulgare* par Brian C. Sutton en 1996 notamment en Crète [215]. L'endophyte *Nemania serpens* a été isolé au Canada à partir de raisins et de ses feuilles. Nombreux des métabolites secondaires de cet endophyte ont été isolés, caractérisés et étudiés. Ils ont montré des activités antibactériennes intéressantes et prometteuses en tant qu'agents de biocontrôle [216]. Enfin, *Arthrinium* sp., isolé à partir de *Smallanthus sonchifolius*, poire de terre ou Yacón pour les habitants des Andes, a montré des propriétés antifongiques et antibactériennes [217][218].

2. Résultats des cultures fongiques

2.1 Etude des conditions de culture des micro-organismes endophytes

2.1.1 Optimisation des milieux de culture des endophytes

Dans un second temps, l'effet du milieu de culture sur la croissance des endophytes a été observé en testant quatre milieux différents : un milieu simple à base de PDA, un milieu simple à base de MEA, un milieu contenant du PDA supplémenté d'extrait aqueux d'Immortelle et un milieu au MEA supplémenté d'extrait aqueux d'Immortelle.

Les conditions de culture des micro-organismes sont cruciales au regard de la production des métabolites. En effet, la culture des endophytes en dehors de leur environnement naturel, la plante, sur des milieux microbiologiques standards, *in vitro*, peut entraîner la perte de synthèse de certains composés au fur et à mesure des repiquages ainsi qu'une modification morphologique des champignons [34]. Certains endophytes sont capables de pousser lors de l'isolement initial à partir du végétal frais mais par la suite, en conditions de laboratoire, leur croissance n'est pas reproductible. Cela pourrait être dû à des résidus et des métabolites spécifiques de la plante toujours présents lors de l'isolement mais absents après plusieurs recultures [219]. De plus, certaines voies métaboliques sont parfois communes à la plante hôte et à l'endophyte. Ainsi si l'endophyte n'a pas accès à toutes les ressources alors sa production de composés en culture axénique ne sera pas possible [220].

Les essais sur les milieux au MEA n'ayant été faits qu'une seule fois, une conclusion quant à la croissance fongique sur ces derniers n'a pas été possible.

Seulement les milieux au PDA sont donc retranscrits.

Tableau 15 : comparaison des cultures des isolats sur deux milieux différents.

Isolats	Souches	Milieu de culture	
		PDA	PDA + Extrait Feuilles
HI 2, HI 5, HI 7	<i>Alternaria alternata</i>		Pas de différence
HI 4	<i>Penicillium murcianum</i>		Pas de différence
HI 6	<i>Penicillium murcianum</i>	+	++
HI 8	<i>Truncatella helichrysi</i>		Pas de différence
HI 9, HI 10, HI 14, HI 15	<i>Didymella pinodella</i>		Pas de différence
HI 12	<i>Aureobasidium pullulans</i>		Pas de différence
HI 13	<i>Nemania serpens</i>	+	+++
HI 16	**		Pas de différence
HI 17	***		Pas de différence

La culture des isolats sur différents milieux (PDA seulement et PDA supplémenté d'extrait aqueux de feuilles d'Immortelle) a bien montré des différences dans la pousse des endophytes. En effet, on voit que pour 7 des souches (*Alternaria alternata*, un des deux isolats de *Penicillium murcianum*, *Didymella pinodella*, *Aureobasidium pullulans*, HI 16 et HI 17) le milieu de culture n'influe pas la pousse des champignons, ils poussent aussi bien sur le PDA seul que sur le PDA supplémenté en extrait de feuilles d'Immortelle. En revanche, pour *Penicillium murcianum* HI6 et *Nemania serpens*, il y a une nette différence : ces deux souches poussent mieux sur le milieu supplémenté en extrait de feuilles que sur le milieu simple.

2.2 Etude préliminaire de l'activité antifongique de l'huile essentielle

Dans un premier temps, l'effet de l'huile essentielle d'Immortelle dans l'atmosphère de culture des endophytes a été observé. Le pouvoir antifongique de l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* a été étudié *in vitro* vis-à-vis des endophytes isolés et caractérisés de l'Immortelle par la méthode des micro-atmosphères avec différents volumes d'huile essentielle déposés sur les disques de papier Wattman. Après une semaine de culture, la mesure des diamètres de pousse du mycélium est faite pour calculer le pourcentage d'inhibition (**tableaux 16**).

Tableau 16 : Activité antifongique de l'huile essentielle d'*H. italicum* envers *P. murcarium*, *T. helichrysi*, *D. pinodella*, *A. pullulans*, *N. serpens*, HI 16 et HI 17.

		Volumes huile essentielle			
		0 μ l	2,5 μ l	5 μ l	10 μ l
		% d'inhibition			
HI 6	<i>Penicillium murcarium</i>	0	*	*	*
HI8	<i>Truncatella helichrysi</i>	0	100	100	100
HI 9, HI 10, HI 14, HI 15	<i>Didymella pinodella</i>	0	100	100	100
HI 12	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	68,42	78,95	100
HI 13	<i>Nemania serpens</i>	0	50	100	100
HI 16	**	0	81,25	100	100
HI 17	***	0	11,11	38,78	44,44

*: Croissance dispersée sur l'ensemble des boîtes, il est donc impossible de mesurer des diamètres. Mais il n'y a aucune inhibition retrouvée.

L'huile essentielle semble inhiber la croissance de tous les champignons. D'une façon globale, on pourrait penser que l'activité antifongique est proportionnelle au volume d'huile essentielle déposé sur le disque de papier : plus le volume est grand, moins les endophytes poussent (**figure 40**).

D'après une étude portant sur le potentiel antifongique des huiles essentielles [221], l'activité relevée ici pourrait être due à l'action synergique d'un oxyde terpénique, le 1,8-cinéole, et de cétones, les β -dicétones, contenus dans l'huile essentielle d'Immortelle.

Cependant, des conclusions sont difficiles à tirer de cette étude préliminaire de l'activité antifongique de l'huile essentielle. En effet, il faudrait réaliser l'expérimentation en triple afin de pouvoir conclure et tester l'action singulière des composés cités.

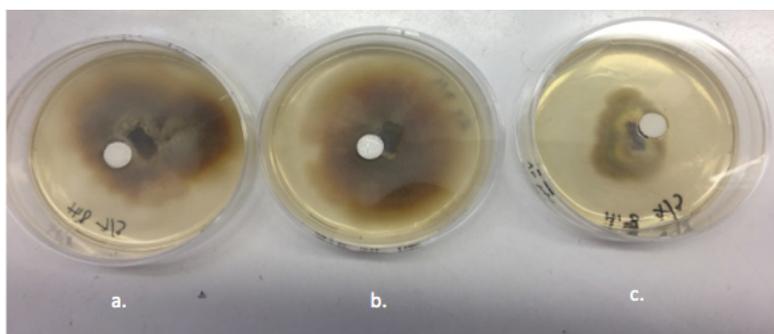


Figure 40 : test des microatmosphères sur *Truncatella helichrysi*. (a.) Volume d'huile essentielle = 2,5 μ l. (b.) Volume d'huile essentielle = 5 μ l. (c.) Volume d'huile essentielle = 10 μ l.

2.2.1 Bilan

De ces deux essais, une observation peut être faite : *Nemania serpens* montre une croissance fortement inhibée par l'huile essentielle d'Immortelle alors que la souche pousse bien mieux sur du PDA supplémenté d'extrait de feuilles d'Immortelle.

Un effet négatif de l'huile essentielle sur la croissance mycélienne est donc mis en évidence dans le premier essai alors qu'un effet positif du milieu de culture supplémenté d'extrait aqueux de feuilles d'Immortelle est souligné dans le second.

Les endophytes ont été isolés des feuilles de la plante contrairement à l'huile essentielle qui est extraite des sommités fleuries. Comme l'étude sur l'endophyte *Paraconiothyrium variable* isolé de *Cephalotaxus harringtonia* le montre [197], *Nemania serpens* pourrait avoir la capacité de biotransformer certains composés produits par la plante

afin de promouvoir sa propre croissance grâce à l'absence des composés initialement présents et/ou grâce aux nouveaux métabolites formés.

De plus, une autre hypothèse peut être formulée : l'extrait aqueux réalisé à partir des feuilles, et qui permet à certaines souches une meilleure croissance mycélienne, pourrait ne pas contenir les composés inhibiteurs de la croissance mycélienne, ou alors dans des concentrations moindres que celles retrouvées dans l'huile essentielle et inhibant la croissance de toutes les souches testées.

3. Résultats des bioconversions des composés isolés de l'huile essentielle par les endophytes de la plante

Les endophytes et leur machinerie enzymatique efficace, sont capables de biotransformer de nombreuses molécules. Après récolte et filtration des biomasses issues de la culture des endophytes dans un milieu liquide, ces biomasses ont été remises en suspension dans un tampon phosphate-citrate auquel une quantité déterminée de substrat a été ajoutée. A la suite de cette incubation de 5 jours, une extraction à l'EtOAc a été réalisée sur les échantillons puis ces derniers ont été injectés en GC-FID et GC-MS pour les analyser et mettre en évidence la présence ou non de nouvelles molécules issues des bioconversions.

2.1 Bioconversion de la fraction enrichie en esters de néryle

La fraction F4 (obtenue après fractionnement d'une huile essentielle commerciale) est majoritairement composée de deux esters de néryle, à savoir l'acétate (94,1%) et le propionate (2,6%), comme indiqué dans le chromatogramme présenté à la **figure 41**.

Suite à l'incubation de cette fraction par *Alternaria alternata*, nous pouvons observer des biotransformations (**figure 42**), qui se traduisent par une modification de la composition chimique, comme indiquée sur le chromatogramme de la **figure 42**. En effet, il apparaît clairement que les deux esters de néryle sont en partie hydrolysés en nérol (51,6%) et en géraniol (3,4%). Ces identifications ont été réalisées par comparaison des données expérimentales (spectres de masse et indices de rétention) avec celles de la banque de données du laboratoire CPN. Par ailleurs, d'après une étude menée sur la détoxification des esters de phorbol [222], il a été démontré que les endophytes étaient capables d'hydrolyser

des esters grâce à des estérases, notamment des lipases, qu'ils produisent. Cependant, dans notre cas, nous ne pouvons pas avancer le fait que cette hydrolyse traduise une détoxification.

Enfin, un nouveau composé issu de la biotransformation des esters de néryle est observable sur le chromatogramme avec un temps de rétention de 40 min. La comparaison de son spectre de masse avec celle des bibliothèques de référence n'a pas permis de proposer une structure pour ces constituants. Pour l'identifier, il faudrait reproduire cette bioconversion en utilisant une quantité plus importante de fraction afin d'isoler le nouveau produit puis réaliser son élucidation structurale par RMN.

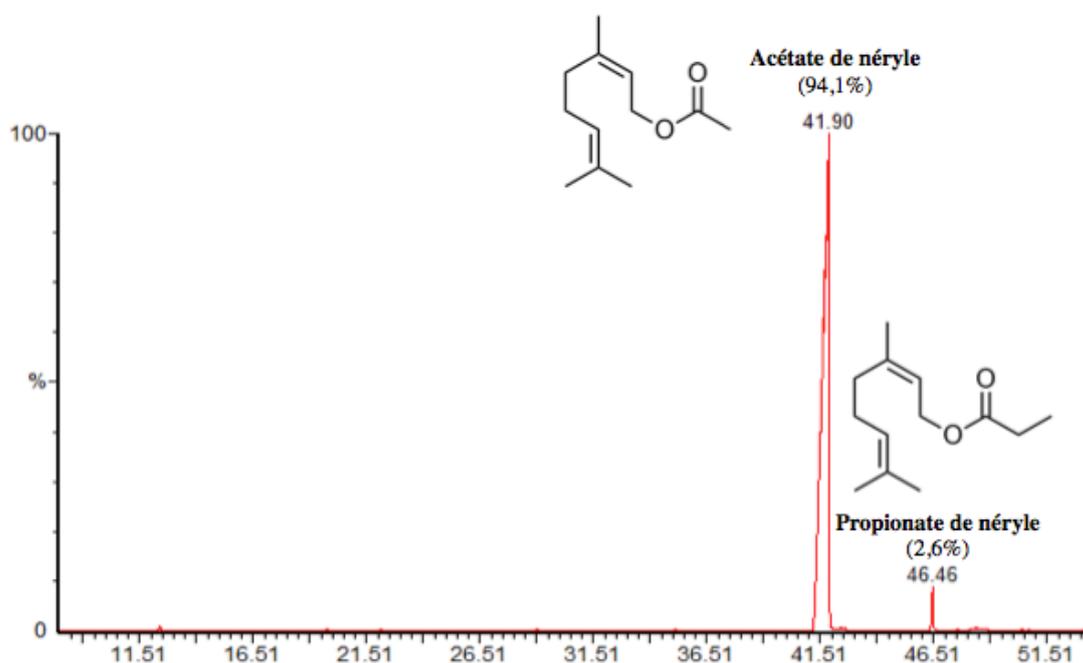


Figure 41 : Chromatogramme sur colonne apolaire de la fraction F4 « esters de néryle » avant biotransformation obtenue par fractionnement de l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum*.

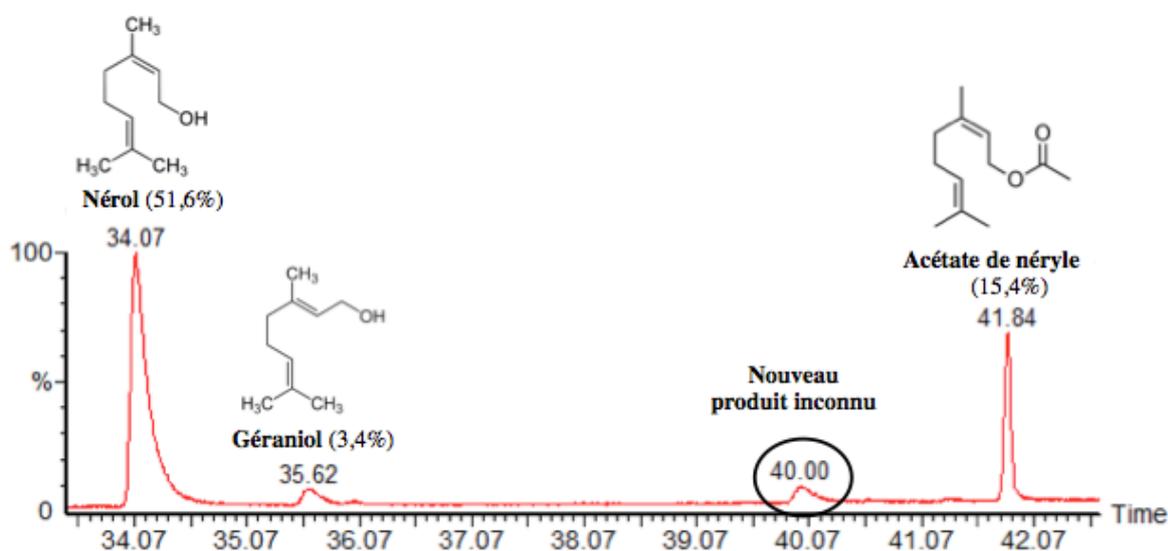


Figure 42 : chromatogramme sur colonne apolaire de la fraction F4 « esters de néryle » après biotransformation par *Alternaria alternata*.

2.2 Bioconversion de la fraction enrichie en β -dicétones

D'après une étude parue dans la revue *Tetrahedron Letters* [223], les micro-organismes endophytes sont capables de réduire les fonctions carbonyles et les doubles liaisons. Pourtant, la réduction microbiologique des dicétones 1,3 est relativement rare. Or, la fraction F9 de l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* retrouvée en Corse contient trois β -dicétones en teneurs relativement abondantes et susceptibles d'être réduites par les champignons endophytes (**figure 43**) : la 4,6-diméthyl-octane-3,5-dione (7,4%), la 4,6,9-triméthyl-déc-8-èn-3,5-dione (48,9%) et la 2,4,6,9-tétraméthyl-déc-8-ène-3,5-dione (30,1%). Nous nous sommes alors demandé si les champignons endophytes isolés de l'Immortelle n'auraient pas développé des enzymes capables de faire ces réductions.

Après incubation de cette fraction enrichie en β -dicétones avec *Alternaria alternata* une première biotransformation a été mise en évidence, un nouveau composé (absent de la fraction avant biotransformation, **figure 44 a**) apparaît sur le chromatogramme au temps de rétention $R_t = 48,29$ min (**figure 44 b**). La comparaison du spectre de masse et des indices de rétention de ce constituant avec ceux des bibliothèques de données n'a pas permis l'identification.

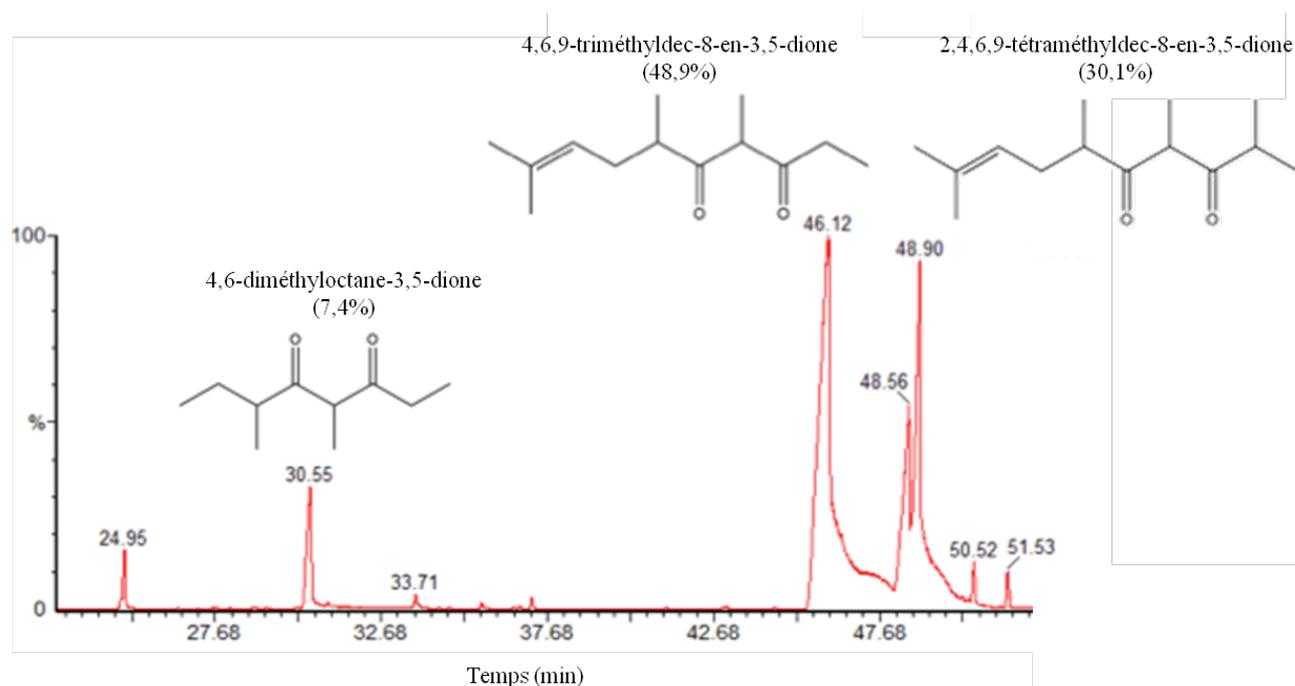


Figure 43 : Chromatogramme de la fraction enrichie en β -dicétones (avant biotransformation) obtenue par fractionnement de l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum*.

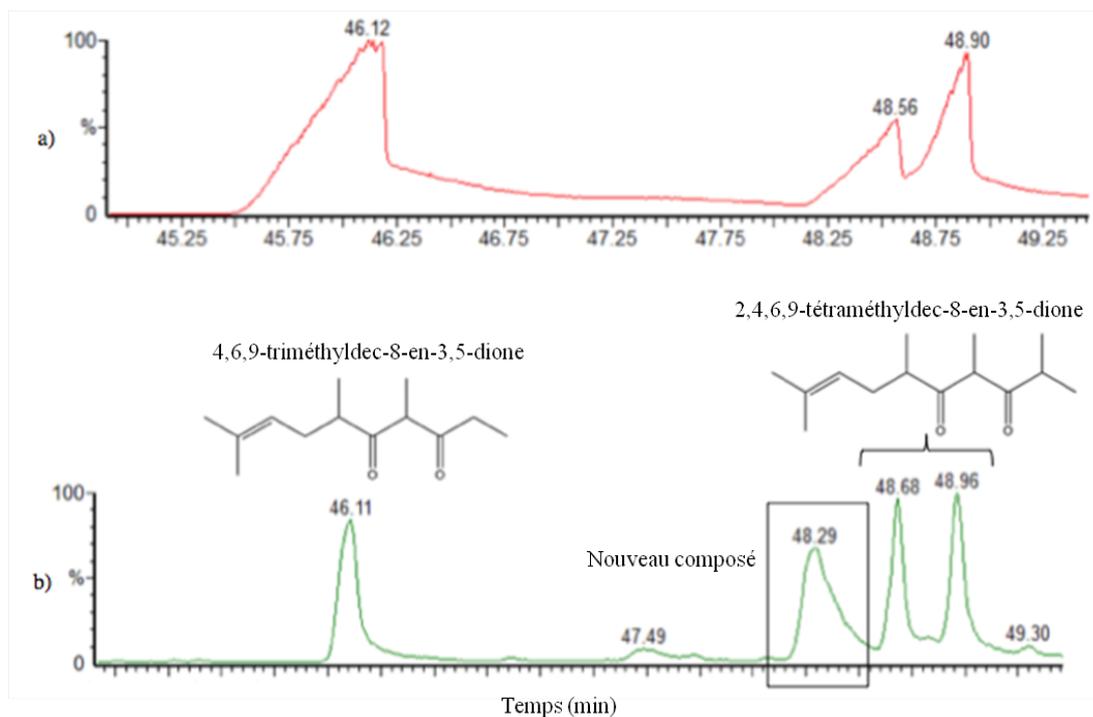


Figure 44 : (a) agrandissement (entre 45 et 50 min) du chromatogramme de la fraction enrichie en β -dicétones avant biotransformation par *Alternaria alternata*, (b) agrandissement du chromatogramme (entre 45 et 50 min) de la fraction enrichie en β -dicétones après biotransformation.

Afin de proposer une structure probable pour cette molécule issue de la biotransformation, nous avons procédé à un examen détaillé de son spectre de masse et de ses fragmentations en les comparant à celles des β -dicétones, et plus particulièrement à la 4,6,9-triméthyldec-8-en-3,5-dione ($M=210$) dont le spectre de masse est présenté à la **figure 45**. Ce dernier présente un ion moléculaire M^+ à m/z 210 alors que celui du nouveau constituant à $tr = 48,28$ min exhibe un M^+ à m/z 212 (**figure 46**). Cette première observation permet de confirmer la réduction de la 4,6,9-triméthyldec-8-en-3,5-dione ; cette réduction est possible en position 3 ou 5, au niveau des fonctions cétones, ou en position 8, au niveau de la double liaison.

Par ailleurs, les ions fragments abondants à m/z 55, 57, 69, 97 et 125 sur le spectre de masse de la 4,6,9-triméthyldec-8-en-3,5-dione (**figure 45**) sont identiques à ceux retrouvés sur la molécule recherchée à $tr = 48,28$ min (**figure 46**). Cette seconde observation indique que la 4,6,9-triméthyldec-8-en-3,5-dione et la molécule inconnue présentent un motif analogue entre la fonction cétone en C5 et les carbones C10 et C11.

Enfin, le spectre de masse du constituant à $tr = 48,28$ min présente un ion à m/z 194 correspondant à la perte d'une molécule d'eau à partir de l'ion moléculaire $[M-H_2O]^+$. Cette

fragmentation caractéristique d'une fonction alcool n'est pas observée sur le spectre de masse de la β -dicétone (absence d'ions à m/z 192). De ce fait, nous pouvons supposer que la réduction a lieu au niveau de la cétone en position 3 et que la molécule recherchée est probablement la 4,6,9-triméthyldec-8-èn-3-ol-5-one.

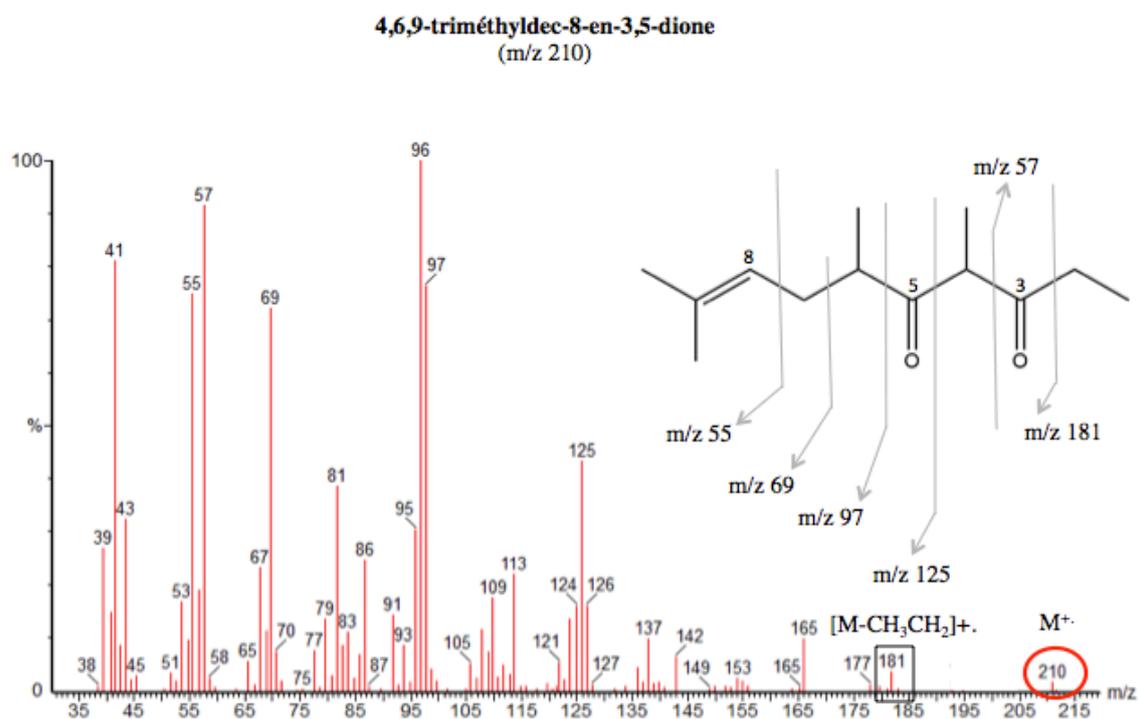


Figure 45 : spectre de masse de la 4,6,9-triméthyldec-8-èn-3,5-dione.

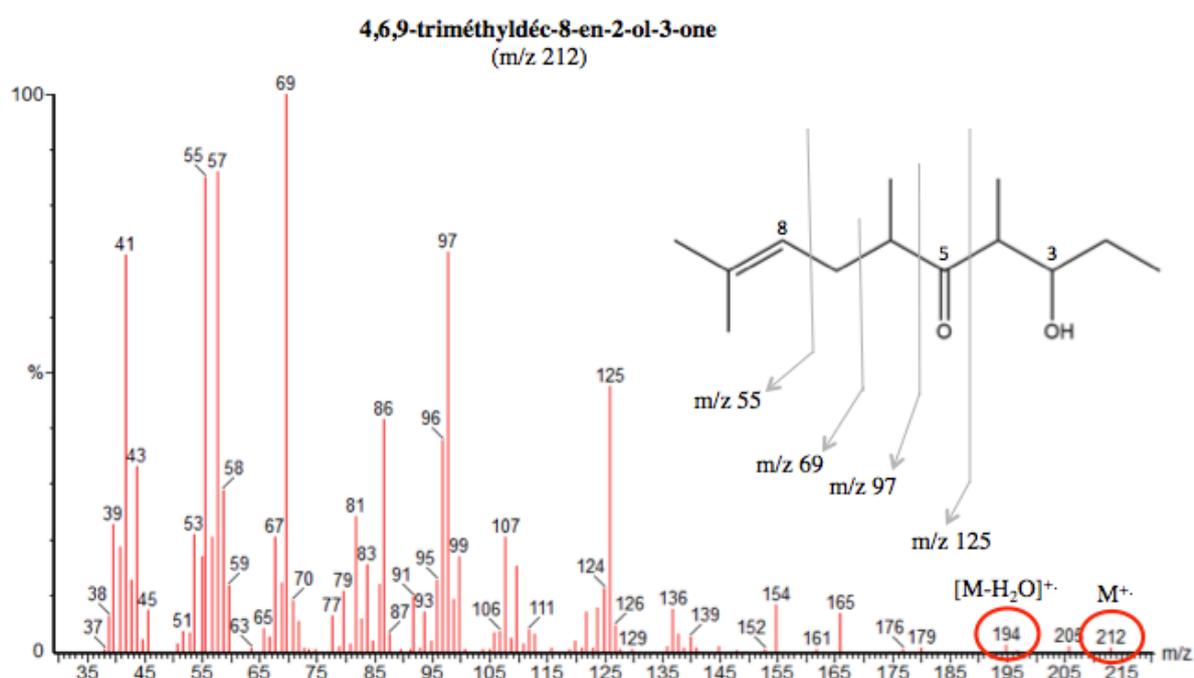


Figure 46 : spectre de masse de la molécule à $t_r = 48, 28$ min après biotransformation de la 4,6,9-triméthyldec-8-èn-3,5-dione par *Alternaria alternata*.

Après incubation de la fraction β -dicétones avec *Penicillium murcianum*, une autre biotransformation a été mise en évidence à partir de la 4,6-diméthyl-octan-3,5-dione (M=170).

En effet, l'observation du chromatogramme de la fraction F9 (après biotransformation) indique la présence d'un composé dérivé de cette β -dicétones au temps de rétention $t_r = 32,81$ min (ici encore, absent des banques de données), alors qu'aucun pic n'apparaît à ce temps de rétention dans la fraction initiale (avant biotransformation) (**figure 47**).

Afin de déterminer la structure de cette nouvelle molécule, nous avons procédé à l'examen approfondi de son spectre de masse et par comparaison avec celui de la 4,6-diméthyl-octan-3,5-dione.

Nous observons pour les deux molécules des ions abondants à m/z 57 et 85 (**figures 48 et 49**). Ces ions confirment la présence d'un motif commun du C5 au C9 pour ces deux constituants. La modification structurale entre ses deux composés se fait donc en aval de la cétone en position 5 et préférentiellement entre le C2 et le C4 (à proximité de la cétone en C3). De plus, le spectre de masse de la 4,6-diméthyl-octan-3,5-dione (**figure 49**) présente un ion moléculaire M^+ à m/z 170 et des ions fragments à m/z 141 et m/z 113 qui correspondent aux fragmentations en amont et en aval de la cétone en C3 (liaison C2-C3 et C3-C4, respectivement). Ces ions fragments ne sont pas observés sur le spectre de masse de la molécule à $t_r = 32,81$ min issue de la biotransformation.

En revanche, son spectre de masse indique la présence d'un ion moléculaire à m/z 154. Cette différence de 16 uma entre la 4,6-diméthyl-octan-3,5-dione (M=170) et la molécule recherchée (M=170), permet de supposer une réduction du carbonyle en C3 de la β -dicétone, suivie d'une déshydratation de la fonction alcool ainsi obtenue.

En effet, cette biotransformation conduit à l'obtention d'un composé stabilisé par un système α,β -insaturé au niveau de la cétone en C5, à savoir le 3,5-diméthyl-octan-5-èn-3-one. Cette proposition de structure pour la molécule à $t_r = 32,81$ min (issue de la biotransformation de la 4,6-diméthyl-octan-3,5-dione par *Penicillium murcianum*) est soutenue par la présence d'ions fragments abondants à m/z 69 et 97 sur son spectre de masse. Ces derniers ont des intensités faibles sur le spectre de masse de la β -dicétone initiale.

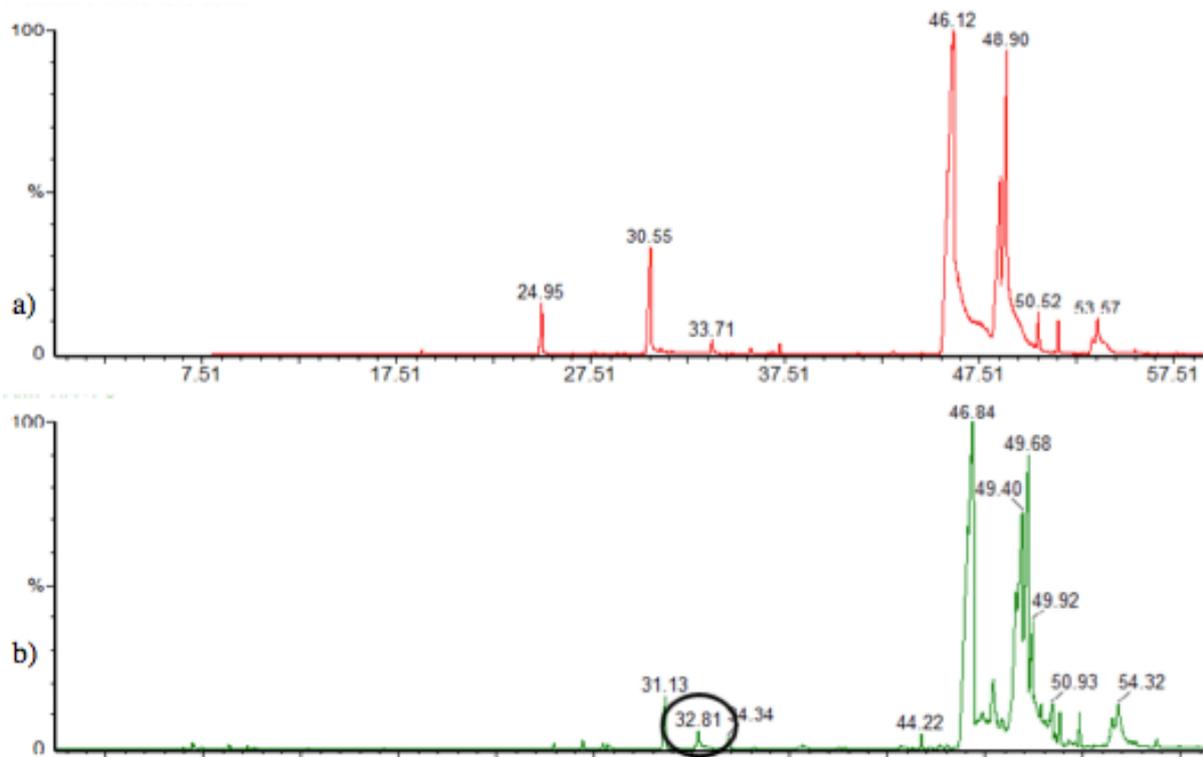


Figure 47 : (a) chromatogramme de la fraction enrichie en β -dicétones avant incubation avec *Penicillium murcianum*. (b) chromatogramme de la fraction enrichie en β -dicétones après incubation avec *Penicillium murcianum*.

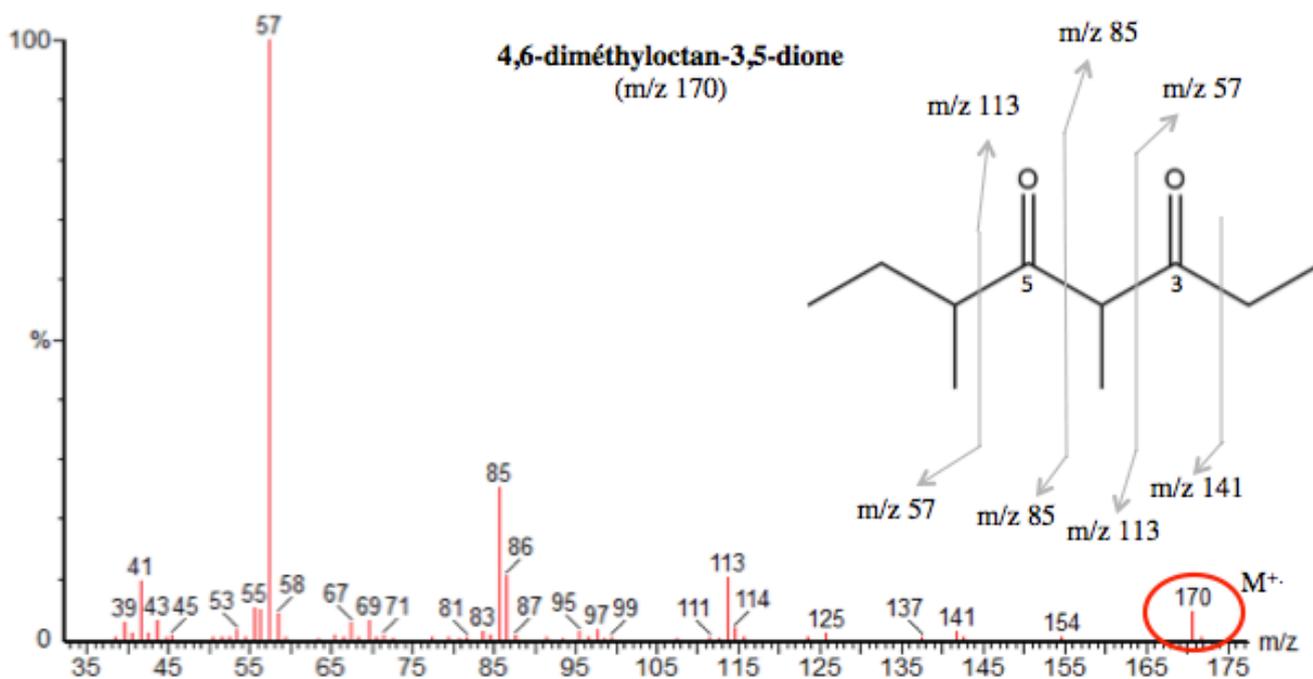


Figure 48 : spectre de masse de la 4,6-diméthyl-octan-3,5-dione.

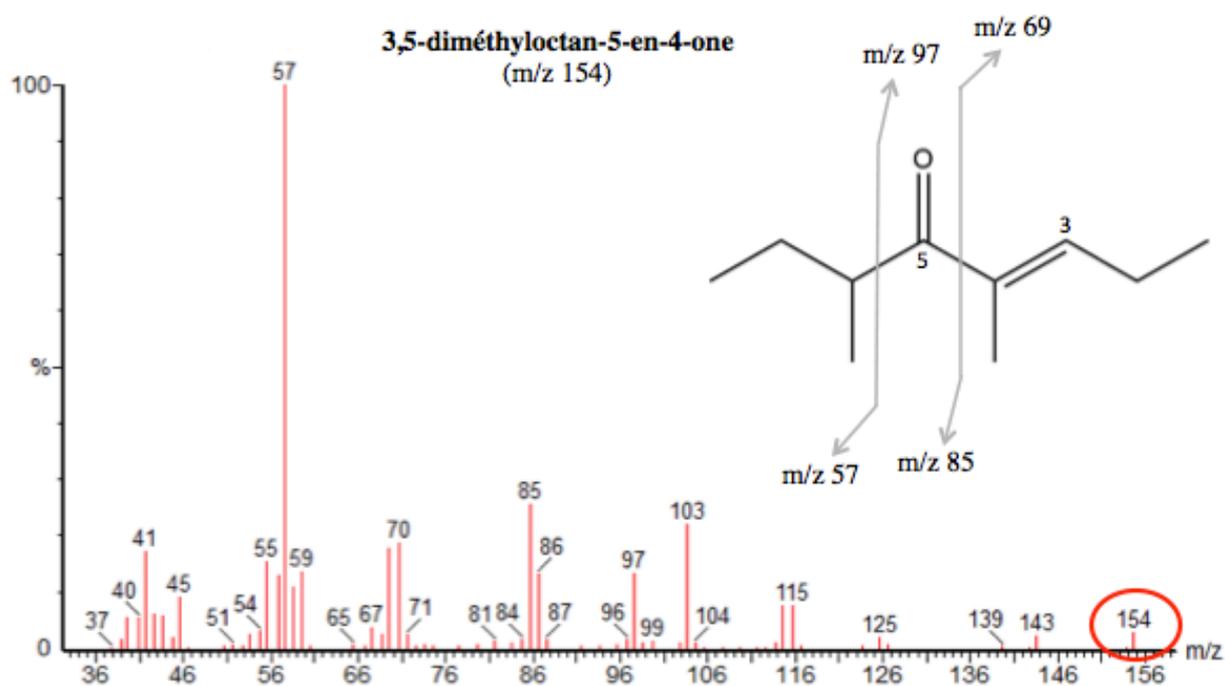


Figure 49 : spectre de masse de la nouvelle molécule après biotransformation de la 4,6,9-triméthyl-déc-8-ène-3,5-dione par *Penicillium murcianum*.

Des endophytes différents sont donc capables de biotransformer les dicétones contenues dans cette fraction. Ces biotransformations témoignent de la richesse des capacités enzymatiques des micro-organismes présents dans l'Immortelle de Corse. D'autres hypothèses ont été formulées quant aux bioconversions médiées par les champignons isolés telles que la réduction de la fonction cétone en position 5 pour la 2,4,6,9-tétraméthyl-déc-8-ène-3,5-dione (M=224). En effet, une molécule issue de la biotransformation de cette dernière a été supposée suite à l'étude d'un spectre de masse avec un ion moléculaire M^+ à m/z 226. Toutefois, des problèmes de co-élutions et la faiblesse des signaux d'intérêt ne nous ont pas permis de conclure de manière certaine.

CONCLUSION

La recherche bibliographique menée lors de la rédaction de ce mémoire fait suite à l'expérience très positive de stage que j'ai pu réaliser lors de ma dernière année d'études. Il fait un état des connaissances sur l'Immortelle d'Italie, les endophytes, leur écologie et leurs capacités de biotransformations.

L'Immortelle d'Italie, de la famille des Asteraceae est un sous-arbrisseau à feuilles vert pale et à fleurs jaune doré. Elle est surtout retrouvée sur le pourtour méditerranéen.

Helichrysum italicum est connue et utilisée en aromathérapie notamment depuis très longtemps. Elle a fait l'objet de nombreuses études qui ont montré que son huile essentielle pouvait avoir des chémotypes différents en fonction de différents paramètres, qu'elle présentait de nombreuses activités pharmacologiques, anti-hématome, anti-inflammatoire, insecticide, cicatrisante. Cette plante trouve donc application dans de très diverses pathologies et symptomatologies.

Comme toutes les plantes, l'Immortelle d'Italie abrite de nombreux micro-organismes et notamment des endophytes.

Les endophytes fongiques représentent un groupe très diversifié principalement constitué d'espèces appartenant au phylum Ascomycota. Ils colonisent asymptotiquement les tissus internes des plantes hôtes. Dans la littérature, on peut retrouver une classification divisant les endophytes en quatre classes en fonction de la famille endophytique concernée, les tissus colonisés et le mode de transmission, verticale ou horizontale.

Leur large distribution et le taux de colonisation élevé des végétaux dans tous les écosystèmes étudiés suggèrent un rôle écologique très important comme notamment la protection des plantes vis – à – vis de nuisibles micro- ou macroscopiques.

Les endophytes fongiques sont également capables de produire un très grand nombre de métabolites secondaires commun à la plante hôte ou non appartenant à des classes chimiques très différentes avec un large spectre d'activité pharmacologique et capables de réaliser des biotransformations. Ils trouvent aussi d'autres applications dans de nombreux domaines de l'industrie.

Cependant, malgré ce remarquable potentiel, leur exploitation commerciale reste difficile à optimiser principalement à cause du faible rendement de production.

Dans une suite logique, les endophytes de l'Immortelle d'Italie ont été étudiés d'un point de vue de leur diversité et de leur capacité de biotransformation lors de mon stage de Master 2.

Tout d'abord, nous avons pu isoler et caractériser huit endophytes différents à partir de la matière végétale fraîche. Des essais d'optimisation des milieux de culture ont été faits afin d'obtenir des biomasses exploitables et correctes pour les essais de biotransformations des différentes fractions obtenues après fractionnement de l'huile essentielle. Les résultats obtenus montrent, en effet, que les milieux de culture ont des conséquences sur la croissance des endophytes : le milieu gélosé supplémenté d'extrait aqueux de feuilles d'Immortelle permet une croissance mycélienne supérieure pour certaines souches fongiques.

De plus, ces micro-organismes sont capables de biotransformer les différentes fractions enrichies en esters de néryle et en β -dicétones. A titre d'exemple, *Alternaria alternata* hydrolyse les esters de néryle en nérol alors que *Alternaria alternata* et *Penicillium murcianum* réduisent et déshydratent les β -dicétones en céto-alcool et monocétone, respectivement.

L'activité antifongique de l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* a également été évaluée avec le test des micro-atmosphères. Ces études ont permis de conclure que l'activité antifongique de l'huile essentielle est proportionnelle à la quantité utilisée. Des tests complémentaires devront être réalisés afin de confirmer cette observation et surtout, pour déterminer les composés à l'origine de ces propriétés antifongiques.

A l'issue de ce stage, diverses questions se sont posées et on ouvert de nouvelles perspectives de travail : *Helichrysum italicum* de Corse présente-t-elle des maladies dues à des phytopathogènes ? Si oui, est-elle protégée par son arsenal chimique ? La cohabitation plante/endophytes permet-elle à la plante de se défendre contre les insectes et autres herbivores ? Si oui, quelles sont les applications phytosanitaires possibles ? Des co-cultures endophytes/phytopathogènes et des cultures simples permettraient de mettre en évidence des composés induits ou réprimés, de les isoler et les purifier pour les tester.

Les Immortelles poussant en plaine ou en altitude, sauvages ou cultivées présentent-elle des différences microbiologiques au niveau des endophytes ? L'échantillonnage régulier d'Immortelle à des périodes de l'année différentes, à des endroits variés et ce, sur plusieurs

années permettrait d'étoffer ces données, de voir l'évolution et les différences quant à la diversité endophytique possible.

Nous pouvons également nous interroger sur la faible proportion d'endophytes isolés à partir d'*Helichrysum italicum* ; ceci peut être dû à la présence de composés toxiques synthétisés par la plante contre les micro-organismes. Si c'est le cas, une détoxification de ces composés par les endophytes isolés est-elle envisageable ?

Enfin, une dernière question mériterait une réponse ; les endophytes participent-ils à la diversité chimique de l'huile essentielle ? Sont-ils capables de produire les mêmes métabolites que la plante ou bien des analogues ? Afin de répondre à ces nombreuses questions, une investigation plus poussée serait nécessaire, notamment par LC-MS. Ces investigations pourraient inclure une étude métabolomique des endophytes qui permettrait une vision plus large du panel de métabolites secondaires qu'ils sont capables de produire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] H.-F. Ji, X.-J. Li, et H.-Y. Zhang, « Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? », *EMBO Rep.*, vol. 10, n° 3, p. 194-200, mars 2009.
- [2] P. B.-B. (Italie) spécial envoyé, « Médecine chinoise, produit d'exportation », *Le Monde.fr*, 17-mai-2012.
- [3] « Dans une herboristerie », *Comptoir de la Thaïlande*. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.comptoir-thaïlande.com/dans-une-herboristerie/>. [Consulté le: 30-mai-2017].
- [4] P. P.-S. spécial envoyé, « En Corée du Nord, la pharmacopée traditionnelle au secours d'un système de santé dégradé », *Le Monde.fr*, 28-juin-2007.
- [5] S. Rahmani, « L'iboga, une racine aux pouvoirs hallucinants », *Le Monde.fr*, 29-nov-2012.
- [6] S. Rahmani, « L'iboga, le "bois sacré" du Gabon », *Le Monde.fr*, 29-nov-2012.
- [7] J. Fleurentin, J.-M. Pelt, et G. Mazars, *Des sources du savoir aux médicaments du futur*. IRD Editions, 2014.
- [8] « Les grands scandales sanitaires dans l'Hexagone depuis 1945 - France 24 ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.france24.com/fr/20101116-grands-scandales-sanitaires-francais-vingtieme-siecle-mediator-hormone-croissance-sang%20contamine-isomeride-distilbene>. [Consulté le: 29-mai-2017].
- [9] H. Ji et H. Zhang, « Multipotent natural agents to combat Alzheimer's disease. Functional spectrum and structural features », *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 29, n° 2, p. 143-151, févr. 2008.
- [10] T. W. Corson et C. M. Crews, « Molecular Understanding and Modern Application of Traditional Medicines: Triumphs and Trials », *Cell*, vol. 130, n° 5, p. 769-774, sept. 2007.
- [11] D. D. Baker, M. Chu, U. Oza, et V. Rajgarhia, « The value of natural products to future pharmaceutical discovery », *Nat. Prod. Rep.*, vol. 24, n° 6, p. 1225-1244, 2007.
- [12] D.-X. Kong, X.-J. Li, et H.-Y. Zhang, « Where is the hope for drug discovery? Let history tell the future », *Drug Discov. Today*, vol. 14, n° 3-4, p. 115-119, févr. 2009.
- [13] « Immortelle ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.florilab.fr/aromatherapie/immortelle.php>. [Consulté le: 29-mai-2017].
- [14] Marcelle Conrad, « Les plantes sauvages dans la vie quotidienne des corses. », 1982.
- [15] D. Antunes Viegas, A. Palmeira-de-Oliveira, L. Salgueiro, J. Martinez-de-Oliveira, et R. Palmeira-de-Oliveira, « Helichrysum italicum: From traditional use to scientific data », *J. Ethnopharmacol.*, vol. 151, n° 1, p. 54-65, janv. 2014.
- [16] G.-X. Culioli, C. Tafanelli, et J.-C. Attard, *Maquis de Corse*, DCL éditions. .
- [17] « Pline : Histoire naturelle : livre XXI (traduction française) ». [En ligne]. Disponible sur: <http://remacle.org/bloodwolf/erudits/plineancien/livre21.htm>. [Consulté le: 30-mai-2017].
- [18] « Coffret Soins du Visage Divine | Coffrets Soins Visage », *L'OCCITANE en Provence*. [En ligne]. Disponible sur: <http://fr.loccitane.com/coffret-soin-du-visage-divine,74,1,55443,1043396.htm>. [Consulté le: 30-mai-2017].
- [19] « IMIZA, marque de cosmétiques corses à l'immortelle - Anne Benoit Création - Imiza ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.imiza.com/fr/>. [Consulté le: 30-mai-2017].
- [20] « L'Occitane s'engage ». [En ligne]. Disponible sur: <http://fr.loccitane.com/occcares,74,1,35457,353762.htm>. [Consulté le: 30-mai-2017].
- [21] Y. Millou, K. Fontes, et C. Tourel, « Cosmetic composition comprising an essential oil extracted from Helichrysum italicum », US7666454 B2, 23-févr-2010.
- [22] V. Voinchet et A.-M. Giraud-Robert, « Utilisation de l'huile essentielle d'hélichryse

italienne et de l'huile végétale de rose musquée après intervention de chirurgie plastique réparatrice et esthétique », *Phytothérapie*, vol. 5, n° 2, p. 67-72.

[23] A. Sala *et al.*, « Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum* », *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 54, n° 3, p. 365-371, mars 2002.

[24] A. Sala *et al.*, « Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside », *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 461, n° 1, p. 53-61, févr. 2003.

[25] A. Nostro, G. Bisignano, M. Angela Cannatelli, G. Crisafi, M. Paola Germanò, et V. Alonzo, « Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus* », *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 17, n° 6, p. 517-520, juin 2001.

[26] A. Nostro, M. p. Germanò, V. D'Angelo, A. Marino, et M. a. Cannatelli, « Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity », *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 30, n° 5, p. 379-384, mai 2000.

[27] V. Lorenzi *et al.*, « Geraniol Restores Antibiotic Activities against Multidrug-Resistant Isolates from Gram-Negative Species », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, n° 5, p. 2209-2211, mai 2009.

[28] « Immortelle ou hélichryse italienne ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.naturemania.com/produits/immortelle.html>. [Consulté le: 31-mai-2017].

[29] A. Nostro *et al.*, « Evaluation of antiherpesvirus-1 and genotoxic activities of *Helichrysum italicum* extract », *New Microbiol.*, vol. 26, n° 1, p. 125-128, janv. 2003.

[30] B. Djihane, N. Wafa, S. Elkhamssa, D. Haro Juan Pedro, A. Esteban Maria, et Z. Mouhamed Mihoub, « Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans* », *Saudi Pharm. J.*, vol. 25, n° 5, p. 780-787, juill. 2017.

[31] R. Meffeï Facino, M. Carini, M. Mariani, et C. Cipriani, « Anti-erythematous and photoprotective activities in guinea pigs and in man of topically applied flavonoids from *helichrysum italicum* G. don », *Acta Ther.*, vol. 14, n° 4, p. 323-345, 1988.

[32] A. C. U. Lourens, A. M. Viljoen, et F. R. van Heerden, « South African *Helichrysum* species: A review of the traditional uses, biological activity and phytochemistry », *J. Ethnopharmacol.*, vol. 119, n° 3, p. 630-652, oct. 2008.

[33] E. Arnold, « Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers », *Fungal Biol. Rev.*, vol. 21, p. 51-66, 2007.

[34] S. Kusari et M. Spiteller, « Metabolomics of Endophytic Fungi Producing Associated Plant Secondary Metabolites: Progress, Challenges and Opportunities », *Roessner U*, p. 241-266, 2012.

[35] S. Kusari, S. P. Pandey, et M. Spiteller, « Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites », *Phytochemistry*, vol. 91, p. 81-87, juill. 2013.

[36] J. Weber, « A natural biological control of Dutch elm disease », *Nature*, vol. 292, p. 449-451, Juillet 1981.

[37] H. W. Zhang, Y. C. Song, et R. X. Tan, « Biology and chemistry of endophytes », *R. Soc. Chem.*, vol. 23, p. 753-771, 2006.

[38] S. Kusari, C. Hertweck, et M. Spiteller, « Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites », *Chem. Biol.*, vol. 19, n° 7, p. 792-798, juill. 2012.

[39] E. Bertaux, « Famille des Astéracées », *Herbier de Lorraine*. [En ligne]. Disponible sur: http://sabots-de-lorraine.over-blog.com/pages/Famille_des_Asteracees-5542509.html. [Consulté le: 31-mai-2017].

[40] « An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV », *Bot. J. Linn. Soc.*, vol. 181, n° 1, p. 1-20, mai 2016.

[41] M. Combalot, « L'Immortelle d'Italie (*Helichrysum italicum*) et son huile esentielle »,

Faculté de Pharmacie de Grenoble, 2013.

- [42] « *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don — The Plant List ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/gcc-34309>. [Consulté le: 25-janv-2018].
- [43] « Composées ou Astéracées ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ecosociosystemes.fr/composees.html>. [Consulté le: 13-déc-2017].
- [44] « Asteraceae — Wikipédia ». [En ligne]. Disponible sur: <https://fr.wikipedia.org/wiki/Asteraceae>. [Consulté le: 13-déc-2017].
- [45] A. PERONNET, « France métropolitaine », *Tela Botanica*. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-31380-synthese>. [Consulté le: 31-mai-2017].
- [46] R. Perrini, I. Morone-Fortunato, E. Lorusso, et P. Avato, « Glands, essential oils and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *microphyllum* (Willd.) Nyman », *Ind. Crops Prod.*, vol. 29, n° 2, p. 395-403, mars 2009.
- [47] A. Bianchini, P. Tomi, J. Costa, et A. F. Bernardini, « Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. subsp. *italicum* essential oils from Corsica (France) », *Flavour Fragr. J.*, vol. 16, n° 1, p. 30-34, janv. 2001.
- [48] « Fiche plante : Immortelle vivace », *Ooreka.fr*. [En ligne]. Disponible sur: <https://jardinage.ooreka.fr/plante/voir/555/immortelle-vivace>. [Consulté le: 04-janv-2018].
- [49] A. Nostro, G. Bisignano, M. Angela Cannatelli, G. Crisafi, M. Paola Germanò, et V. Alonzo, « Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus* », *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 17, n° 6, p. 517-520, juin 2001.
- [50] « L'Hydrodistillation », *Maroc végétal*, 18-oct-2016. .
- [51] « Pranarôm I Distillation et expression ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.pranarom.com/fr/aromatherapie-scientifique/distillation-et-expression>. [Consulté le: 27-déc-2017].
- [52] R. Tundis *et al.*, « Influence of environmental factors on composition of volatile constituents and biological activity of *Helichrysum italicum* (Roth) Don (Asteraceae) », *Nat. Prod. Res.*, vol. 19, n° 4, p. 379-387, juin 2005.
- [53] A. Bianchini, F. Santoni, J. Paolini, A.-F. Bernardini, D. Mouillot, et J. Costa, « Partitioning the Relative Contributions of Inorganic Plant Composition and Soil Characteristics to the Quality of *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* (Roth) G. Don fil. Essential Oil », *Chem. Biodivers.*, vol. 6, n° 7, p. 1014-1033, juill. 2009.
- [54] A. Bruni, M. Ballero, et F. Poli, « Quantitative ethnopharmacological study of the Campidano Valley and Urzulei district, Sardinia, Italy », *J. Ethnopharmacol.*, vol. 57, n° 2, p. 97-124, juill. 1997.
- [55] A. Sala, M. C. Recio, R. M. Giner, S. Máñez, et J. L. Ríos, « New acetophenone glucosides isolated from extracts of *Helichrysum italicum* with antiinflammatory activity », *J. Nat. Prod.*, vol. 64, n° 10, p. 1360-1362, oct. 2001.
- [56] M. Aslan, D. D. Orhan, N. Orhan, E. Sezik, et E. Yeşilada, « A Study of Antidiabetic and Antioxidant Effects of *Helichrysum graveolens* Capitulum in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats », *J. Med. Food*, vol. 10, n° 2, p. 396-400, juin 2007.
- [57] G. Appendino *et al.*, « Arzanol, an Anti-inflammatory and Anti-HIV-1 Phloroglucinol α -Pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum* », *J. Nat. Prod.*, vol. 70, n° 4, p. 608-612, avr. 2007.
- [58] J. Bauer *et al.*, « Arzanol, a prenylated heterodimeric phloroglucinyl pyrone, inhibits eicosanoid biosynthesis and exhibits anti-inflammatory efficacy in vivo », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 81, n° 2, p. 259-268, janv. 2011.
- [59] M. Leonardi *et al.*, « Essential-Oil Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from Elba Island (Tuscany, Italy) », *Chem. Biodivers.*, vol. 10, n° 3, p. 343-355, mars 2013.
- [60] M. Satta, C. I. G. Tuberoso, A. Angioni, F. M. Pirisi, et P. Cabras, « Analysis of the

- Essential Oil of *Helichrysum italicum* G. Don ssp. *microphyllum* (Willd) Nym. », *J. Essent. Oil Res.*, vol. 11, n° 6, p. 711-715, nov. 1999.
- [61] J. Paolini *et al.*, « Composition of essential oils of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil subsp. *italicum* from Tuscan archipelago islands », *Flavour Fragr. J.*, vol. 21, p. 805-808, Mai 2006.
- [62] B. Conti, A. Canale, A. Bertoli, F. Gozzini, et L. Pistelli, « Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito <Emphasis Type="Italic">*Aedes albopictus*</Emphasis> (Diptera: Culicidae) », *Parasitol. Res.*, vol. 107, n° 6, p. 1455-1461, nov. 2010.
- [63] A. Nostro, M. A. Cannatelli, G. Crisafi, A. D. Musolino, F. Procopio, et V. Alonzo, « Modifications of hydrophobicity, in vitro adherence and cellular aggregation of *Streptococcus mutans* by *Helichrysum italicum* extract », *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 38, n° 5, p. 423-427, 2004.
- [64] F. Van Bambeke, E. Balzi, et P. M. Tulkens, « Antibiotic efflux pumps », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 60, n° 4, p. 457-470, août 2000.
- [65] H. Giamarellou, « Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long », *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 36 Suppl 2, p. S50-54, déc. 2010.
- [66] J. Mastelic, O. Politeo, I. Jerkovic, et N. Radosevic, « Composition and Antimicrobial Activity of <Emphasis Type="Italic">*Helichrysum italicum*</Emphasis> Essential Oil and Its Terpene and Terpenoid Fractions », *Chem. Nat. Compd.*, vol. 41, n° 1, p. 35-40, janv. 2005.
- [67] M. J. McCullough, B. C. Ross, et P. C. Reade, « *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation », *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 25, n° 2, p. 136-144, avr. 1996.
- [68] A. Palmeira-de-Oliveira *et al.*, « Anti-*Candida* Activity of Essential Oils », *Mini-Rev. Med. Chem.*, vol. 9, n° 11, p. 1292-1305, 2009.
- [69] A. Roch et J. Allardet-Servent, « Physiopathologie de l'œdème pulmonaire », *Réanimation*, vol. 16, n° 1, p. 102-110, févr. 2007.
- [70] « Réglementation des produits cosmétiques - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé ». [En ligne]. Disponible sur: [http://ansm.sante.fr/Activites/Surveillance-du-marche-des-produits-cosmetiques/Reglementation-des-produits-cosmetiques/\(offset\)/3](http://ansm.sante.fr/Activites/Surveillance-du-marche-des-produits-cosmetiques/Reglementation-des-produits-cosmetiques/(offset)/3). [Consulté le: 03-janv-2018].
- [71] « Histoire des cosmétiques | Regard sur les cosmétiques ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.regard-sur-les-cosmetiques.fr/histoire-des-cosmetiques/>. [Consulté le: 03-janv-2018].
- [72] E. Middleton et G. Drzewiecki, « Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 33, n° 21, p. 3333-3338, nov. 1984.
- [73] « Cosmetic composition comprising an essential oil extracted from *Helichrysum italicum* ».
- [74] S. Wittulsky, C. Pellegrin, A. Giannakopoulou, et R. Böni, « A snapshot of molecular plant–microbe interaction research », *New Phytol.*, vol. 205, n° 2, p. 468-471, janv. 2015.
- [75] R. Ferrière, M. Gauduchon, et J. L. Bronstein, « Evolution and persistence of obligate mutualists and exploiters: competition for partners and evolutionary immunization », *Ecol. Lett.*, vol. 10, n° 2, p. 115-126, févr. 2007.
- [76] P. R. Hardoim *et al.*, « The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes », *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR*, vol. 79, n° 3, p. 293-320, juill. 2015.
- [77] S. Compant, A. Sessitsch, et F. Mathieu, « The 125th anniversary of the first postulation of the soil origin of endophytic bacteria – a tribute to M.L.V. Galippe », *Plant*

Soil, vol. 356, p. 299-301, juill. 2012.

[78] J. Trémouillaux-Guiller, T. Rohr, R. Rohr, et V. A. R. Huss, « Discovery of an endophytic alga in *Ginkgo biloba* », *Am. J. Bot.*, vol. 89, n° 5, p. 727-733, mai 2002.

[79] B. D. Martin et E. Schwab, « Current Usage of Symbiosis and Associated Terminology », *Int. J. Biol.*, vol. 5, n° 1, p. 32, nov. 2012.

[80] O. Petrini, « Fungal Endophytes of Tree Leaves », in *Microbial Ecology of Leaves*, Springer, New York, NY, 1991, p. 179-197.

[81] B. Reiter, U. Pfeifer, H. Schwab, et A. Sessitsch, « Response of Endophytic Bacterial Communities in Potato Plants to Infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, n° 5, p. 2261-2268, mai 2002.

[82] A. E. Arnold et F. Lutzoni, « Diversity and Host Range of Foliar Fungal Endophytes: Are Tropical Leaves Biodiversity Hotspots? », *Ecology*, vol. 88, n° 3, p. 541-549, mars 2007.

[83] B. Schulz et C. Boyle, « What are Endophytes? », in *Microbial Root Endophytes*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2006, p. 1-13.

[84] B. Schulz, C. Boyle, S. Draeger, A.-K. Römmert, et K. Krohn, *Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites* * * Paper presented at the British Mycological Society symposium on Fungal Bioactive Compounds, held at the University of Wales Swansea on 22–27 April 2001, vol. 106. 2002.

[85] B. Schulz et C. Boyle, « The endophytic continuum », *Mycol. Res.*, vol. 109, n° 6, p. 661-686, juin 2005.

[86] D. Malinowski et D. Belesky, « Adaptations of Endophyte-Infected Cool-Season Grasses to Environmental Stresses », *Crop Sci*, vol. 40, p. 923-940, juill. 2000.

[87] T. L. F. Leung et R. Poulin, « Parasitism, commensalism and mutualism: exploring the many shades of symbioses. », *Life Environ.*, vol. 58, p. 107-115, 2008.

[88] R. S. Redman, J. C. Ranson, et R. J. Rodriguez, « Conversion of the Pathogenic Fungus *Colletotrichum magna* to a Nonpathogenic, Endophytic Mutualist by Gene Disruption », *Mol. Plant. Microbe Interact.*, vol. 12, n° 11, p. 969-975, nov. 1999.

[89] G. Carroll, « Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont », *Ecology*, vol. 69, n° 1, p. 2-9, 1988.

[90] R. S. Redman, D. D. Dunigan, et R. J. Rodriguez, « Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? », *New Phytol.*, vol. 151, n° 3, p. 705-716, sept. 2001.

[91] A. Staniek, H. J. Woerdenbag, et O. Kayser, « Endophytes: exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery », *J. Plant Interact.*, vol. 3, n° 2, p. 75-93, juin 2008.

[92] A. E. Arnold, « Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers », *Fungal Biol. Rev.*, vol. 21, n° 2, p. 51-66, mai 2007.

[93] T. Tintjer, A. Leuchtman, et K. Clay, « Variation in horizontal and vertical transmission of the endophyte *Epichloë elymi* infecting the grass *Elymus hystrix* », *New Phytol.*, vol. 179, n° 1, p. 236-246, 2008.

[94] M. Beyer, S. Röding, A. Ludewig, et J.-A. Verreet, « Germination and Survival of *Fusarium graminearum* Macroconidia as Affected by Environmental Factors », *J. Phytopathol.*, vol. 152, n° 2, p. 92-97, févr. 2004.

[95] L. B. Abbott et B. A. Roundy, « Available Water Influences Field Germination and Recruitment of Seeded Grasses », *J. Range Manag.*, vol. 56, n° 1, p. 56-64, 2003.

[96] G. Meijer et A. Leuchtman, « The effects of genetic and environmental factors on disease expression (stroma formation) and plant growth in *Brachypodium sylvaticum* infected by *Epichloë sylvatica* », *Oikos*, vol. 91, n° 3, p. 446-458, déc. 2000.

[97] K. Clay et C. Schardl, « Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses », *Am. Nat.*, vol. 160 Suppl 4, p. S99-S127, oct. 2002.

- [98] S. Hodgson, C. Cates, J. Hodgson, N. J. Morley, B. C. Sutton, et A. C. Gange, « Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs », *Ecol. Evol.*, vol. 4, n° 8, p. 1199-1208, avr. 2014.
- [99] J. Jaenike, « Effectively vertical transmission of a *Drosophila*-parasitic nematode: mechanism and consequences », *Ecol. Entomol.*, vol. 25, n° 4, p. 395-402, nov. 2000.
- [100] R. J. Rodriguez, J. F. White Jr, A. E. Arnold, et R. S. Redman, « Fungal endophytes: diversity and functional roles », *New Phytol.*, vol. 182, n° 2, p. 314-330, avr. 2009.
- [101] S. Florea, D. G. Panaccione, et C. L. Schardl, « Ergot Alkaloids of the Family Clavicipitaceae », *Phytopathology*, vol. 107, n° 5, p. 504-518, mai 2017.
- [102] A. Koroch *et al.*, « Examination of plant biotrophy in the scale insect parasitizing Fungus *Dussiella tuberiformis* », *Symbiosis*, vol. 37, p. 267-280, janv. 2004.
- [103] J. W. Spatafora, G.-H. Sung, J.-M. Sung, N. L. Hywel-Jones, et J. F. White, « Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes », *Mol. Ecol.*, vol. 16, n° 8, p. 1701-1711, avr. 2007.
- [104] M. S. Torres, A. P. Singh, N. Vorsa, T. Gianfagna, et J. F. White Jr, « Were endophytes pre-adapted for defensive mutualism? » New Zealand Grassland Association: Endophyte Symposium, 2007.
- [105] K. Clay, « Fungal Endophytes of Grasses: A Defensive Mutualism between Plants and Fungi », *Ecology*, vol. 69, n° 1, p. 10-16, févr. 1988.
- [106] K. Saikkonen, M. Helander, S. H. Faeth, F. Schulthess, et D. Wilson, « Endophyte-grass-herbivore interactions: the case of *Neotyphodium* endophytes in Arizona fescue populations », *Oecologia*, vol. 121, n° 3, p. 411-420, nov. 1999.
- [107] S. H. Faeth, D. R. Gardner, C. J. Hayes, A. Jani, S. K. Wittlinger, et T. A. Jones, « Temporal and Spatial Variation in Alkaloid Levels in *Achnatherum robustum*, a Native Grass Infected with the Endophyte *Neotyphodium* », *J. Chem. Ecol.*, vol. 32, n° 2, p. 307, févr. 2006.
- [108] D. D. Rowan et D. L. Gaynor, « Isolation of feeding deterrents against argentine stem weevil from ryegrass infected with the endophyte *Acremonium loliae* », *J. Chem. Ecol.*, vol. 12, n° 3, p. 647-658, mars 1986.
- [109] A. Tanaka, B. A. Tapper, A. Popay, E. J. Parker, et B. Scott, « A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory », *Mol. Microbiol.*, vol. 57, n° 4, p. 1036-1050, août 2005.
- [110] M.-A. Selosse, M. Vohník, et E. Chauvet, « Out of the rivers: are some aquatic hyphomycetes plant endophytes? », *New Phytol.*, vol. 178, n° 1, p. 3-7, avr. 2008.
- [111] M. Mucciarelli, S. Scannerini, C. Berteà, et M. Maffei, « In vitro and in vivo peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization », *New Phytol.*, vol. 158, n° 3, p. 579-591, juin 2003.
- [112] L. M. Márquez, R. S. Redman, R. J. Rodriguez, et M. J. Roossinck, « A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance », *Science*, vol. 315, n° 5811, p. 513-515, janv. 2007.
- [113] R. S. Redman, S. Freeman, D. R. Clifton, J. Morrel, G. Brown, et R. J. Rodriguez, « Biochemical Analysis of Plant Protection Afforded by a Nonpathogenic Endophytic Mutant of *Colletotrichum magna* », *Plant Physiol.*, vol. 119, n° 2, p. 795-804, févr. 1999.
- [114] A. Jumpponen et J. M. Trappe, « Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi », *New Phytol.*, vol. 140, n° 2, p. 295-310, oct. 1998.
- [115] A. Stierle, G. Strobel, et D. Stierle, « Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew », *Science*, vol. 260, n° 5105, p. 214-216, avr. 1993.
- [116] J. D. P. Bezerra *et al.*, « Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata* :

- Diversity and biotechnological potential », *Braz. J. Microbiol.*, vol. 46, n° 1, p. 49-57, mars 2015.
- [117] S. Sirikantaramas, T. Asano, H. Sudo, M. Yamazaki, et K. Saito, « Camptothecin: therapeutic potential and biotechnology », *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 8, n° 4, p. 196-202, août 2007.
- [118] G. E. Veitch, A. Boyer, et S. V. Ley, « The azadirachtin story », *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, vol. 47, n° 49, p. 9402-9429, 2008.
- [119] S. Kusari, V. C. Verma, M. Lamshoeft, et M. Spiteller, « An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin », *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 28, n° 3, p. 1287-1294, mars 2012.
- [120] A. L. Demain et S. Sanchez, « Microbial drug discovery: 80 years of progress », *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 62, n° 1, p. 5-16, janv. 2009.
- [121] A. A. L. Gunatilaka, « Natural Products from Plant-associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence », *J. Nat. Prod.*, vol. 69, n° 3, p. 509-526, mars 2006.
- [122] H. Nisa, A. N. Kamili, I. A. Nawchoo, S. Shafi, N. Shameem, et S. A. Bandh, « Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review », *Microb. Pathog.*, vol. 82, p. 50-59, mai 2015.
- [123] J. Zhao *et al.*, « Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants », *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.*, vol. 1, p. 567-576, janv. 2010.
- [124] S. C. Puri, V. Verma, T. Amna, G. N. Qazi, et M. Spiteller, « An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin », *J. Nat. Prod.*, vol. 68, n° 12, p. 1717-1719, déc. 2005.
- [125] S. Shweta, B. R. Gurumurthy, G. Ravikanth, U. S. Ramanan, et M. B. Shivanna, « Endophytic fungi from *Miquelia dentata* Bedd., produce the anti-cancer alkaloid, camptothecine », *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.*, vol. 20, n° 3-4, p. 337-342, févr. 2013.
- [126] P. P. C. Palem, G. C. Kuriakose, et C. Jayabaskaran, « An Endophytic Fungus, *Talaromyces radicus*, Isolated from *Catharanthus roseus*, Produces Vincristine and Vinblastine, Which Induce Apoptotic Cell Death », *PLoS ONE*, vol. 10, n° 12, déc. 2015.
- [127] S. Chandra, « Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 95, n° 1, p. 47-59, juill. 2012.
- [128] R. N. Kharwar, A. Mishra, S. K. Gond, A. Stierle, et D. Stierle, « Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges », *Nat. Prod. Rep.*, vol. 28, n° 7, p. 1208-1228, juill. 2011.
- [129] H. Yu *et al.*, « Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes », *Microbiol. Res.*, vol. 165, n° 6, p. 437-449, août 2010.
- [130] G. Strobel et B. Daisy, « Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products », *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 67, n° 4, p. 491-502, déc. 2003.
- [131] A. Stierle, G. Strobel, D. Stierle, P. Grothaus, et G. Bignami, « The Search for a Taxol-Producing Microorganism Among the Endophytic Fungi of the Pacific Yew, *Taxus brevifolia* », *J. Nat. Prod.*, vol. 58, n° 9, p. 1315-1324, sept. 1995.
- [132] G. A. Strobel, R. V. Miller, C. Martinez-Miller, M. M. Condron, D. B. Teplow, et W. M. Hess, « Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina* », *Microbiol. Read. Engl.*, vol. 145 (Pt 8), p. 1919-1926, août 1999.
- [133] R. X. Tan et W. X. Zou, « Endophytes: a rich source of functional metabolites », *Nat. Prod. Rep.*, vol. 18, n° 4, p. 448-459, août 2001.
- [134] H. C. Ong et M. Nordiana, « Malay ethno-medico botany in Machang, Kelantan, Malaysia », *Fitoterapia*, vol. 70, n° 5, p. 502-513, oct. 1999.

- [135] G. A. Petsko, « For medicinal purposes », *Nature*, vol. 384, n° 6604 Suppl, p. 7-9, nov. 1996.
- [136] A. Alvin, K. I. Miller, et B. A. Neilan, « Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds », *Microbiol. Res.*, vol. 169, n° 7, p. 483-495, juill. 2014.
- [137] M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, et A. T. McPhail, « Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 93, n° 9, p. 2325-2327, mai 1971.
- [138] B. A. Weaver, « How Taxol/paclitaxel kills cancer cells », *Mol. Biol. Cell*, vol. 25, n° 18, p. 2677-2681, sept. 2014.
- [139] L. J. Wagner et H. E. Flores, « Effect of Taxol and related compounds on growth of plant pathogenic fungi », *Biochem. Cell Biol.*, vol. 84, n° 10, p. 1173-1178, 1994.
- [140] « Paclitaxel — Wikipédia ». [En ligne]. Disponible sur: <https://fr.wikipedia.org/wiki/Paclitaxel>. [Consulté le: 06-déc-2017].
- [141] S. Band Horwitz, « Mechanism of action of taxol », *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 13, n° Supplement C, p. 134-136, janv. 1992.
- [142] K. E. Gascoigne et S. S. Taylor, « How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? », *J. Cell Sci.*, vol. 122, n° 15, p. 2579-2585, août 2009.
- [143] « Podophyllotoxine — Wikipédia ». [En ligne]. Disponible sur: <https://fr.wikipedia.org/wiki/Podophyllotoxine>. [Consulté le: 06-déc-2017].
- [144] N. Asai, Y. Ohkuni, N. Kaneko, E. Yamaguchi, et A. Kubo, « Relapsed small cell lung cancer: treatment options and latest developments », *Ther. Adv. Med. Oncol.*, vol. 6, n° 2, p. 69-82, mars 2014.
- [145] W. D. Kingsbury *et al.*, « Synthesis of water-soluble (aminoalkyl)camptothecin analogs: inhibition of topoisomerase I and antitumor activity », *J. Med. Chem.*, vol. 34, n° 1, p. 98-107, janv. 1991.
- [146] L. Yang *et al.*, « The Effects of Psychological Stress on Depression », *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 13, n° 4, p. 494-504, juill. 2015.
- [147] S. Kusari, M. Lamshöft, S. Zühlke, et M. Spiteller, « An Endophytic Fungus from *Hypericum perforatum* that Produces Hypericin », *J. Nat. Prod.*, vol. 71, n° 2, p. 159-162, févr. 2008.
- [148] S. Kusari, S. Zühlke, J. Kosuth, E. Cellárová, et M. Spiteller, « Light-independent metabolomics of endophytic *Thielavia subthermophila* provides insight into microbial hypericin biosynthesis », *J. Nat. Prod.*, vol. 72, n° 10, p. 1825-1835, oct. 2009.
- [149] A. H. Aly, A. Debbab, et P. Proksch, « Fungal endophytes – secret producers of bioactive plant metabolites », *Pharm. - Int. J. Pharm. Sci.*, vol. 68, n° 7, p. 499-505, juill. 2013.
- [150] A. Baldi, V. s. Bisaria, et A. k. Srivastava, « Biotechnological Approaches for the Production of some Promising Plant-Based Chemotherapeutics », in *Medicinal Plant Biotechnology*, O. Kayser et W. J. Quax, Éd. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2006, p. 117-156.
- [151] Z. Lotfi, Y. Aboussaleh, R. Sbaibi, I. Achouri, et R. Benguedour, « Le surpoids, l'obésité et le contrôle glycémique chez les diabétiques du centre de référence provincial de diabète (CRD), Kénitra, Maroc », *Pan Afr. Med. J.*, vol. 27, juill. 2017.
- [152] B. Zhang *et al.*, « Discovery of a Small Molecule Insulin Mimetic with Antidiabetic Activity in Mice », *Science*, vol. 284, n° 5416, p. 974-977, mai 1999.
- [153] J. A. Levy, « HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges », *AIDS Lond. Engl.*, vol. 23, n° 2, p. 147-160, janv. 2009.
- [154] P. M. Sharp et B. H. Hahn, « Origins of HIV and the AIDS Pandemic », *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 1, n° 1, sept. 2011.
- [155] B. P. Wellensiek, R. Ramakrishnan, B. P. Bashyal, Y. Eason, A. A. L. Gunatilaka, et

- N. Ahmad, « Inhibition of HIV-1 Replication by Secondary Metabolites From Endophytic Fungi of Desert Plants », *Open Virol. J.*, vol. 7, p. 72-80, juill. 2013.
- [156] M. P. Singh *et al.*, « Biological activity of guanacastepene, a novel diterpenoid antibiotic produced by an unidentified fungus CR115 », *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 53, n° 3, p. 256-261, mars 2000.
- [157] F. Peláez *et al.*, « The Discovery of Enfumafungin, a Novel Antifungal Compound Produced by an Endophytic Hormonema Species Biological Activity and Taxonomy of the Producing Organisms », *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 23, n° 3, p. 333-343, oct. 2000.
- [158] J. C. Lee, E. Lobkovsky, N. B. Pliam, G. Strobel, et J. Clardy, « Subglutinols A and B: Immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans* », *J. Org. Chem.*, vol. 60, n° 22, p. 7076-7077, nov. 1995.
- [159] G. Strobel et N. B. Pliam, « Immunosuppressant diterpene compound », US5648376A, 15-juill-1997.
- [160] A. A. Stierle et D. B. Stierle, « Bioactive Secondary Metabolites Produced by the Fungal Endophytes of Conifers », *Nat. Prod. Commun.*, vol. 10, n° 10, p. 1671-1682, oct. 2015.
- [161] J. Aleu et I. G. Collado, « Biotransformations by *Botrytis* species », *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 13, n° 4, p. 77-93, mai 2001.
- [162] K. B. Borges, W. de S. Borges, R. Durán-Patrón, M. T. Pupo, P. S. Bonato, et I. G. Collado, « Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts », *Tetrahedron Asymmetry*, vol. 20, n° 4, p. 385-397, mars 2009.
- [163] J. L. Bicas, A. P. Dionísio, et G. M. Pastore, « Bio-oxidation of Terpenes: An Approach for the Flavor Industry », *Chem. Rev.*, vol. 109, n° 9, p. 4518-4531, sept. 2009.
- [164] K. B. Borges, W. D. S. Borges, M. T. Pupo, et P. S. Bonato, « Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 77, n° 3, p. 669-674, déc. 2007.
- [165] M. A. Longo et M. A. Sanroman, « Production of Food Aroma Compounds: Microbial and Enzymatic Methodologies », *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 44, n° 3, p. 335-353, 2006.
- [166] A. García-Granados *et al.*, « Biotransformation of ent-13-epi-manoyl oxides difunctionalized at C-3 and C-12 by filamentous fungi », *Phytochemistry*, vol. 65, n° 1, p. 107-115, janv. 2004.
- [167] G. Molina, M. Recco Pimentel, T. Bertucci, et G. Pastore, « Application of fungal endophytes in biotechnological processes », *Chem. Eng. Trans.*, vol. 27, p. 289-294, oct. 2012.
- [168] H. L. Holland et H. K. Weber, « Enzymatic hydroxylation reactions », *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 11, n° 6, p. 547-553, déc. 2000.
- [169] M. Vitas *et al.*, « Induction of steroidal hydroxylase activity by plant defence compounds in the filamentous fungus *Cochliobolus lunatus* », *Chemosphere*, vol. 38, n° 4, p. 853-863, févr. 1999.
- [170] M. R. Maróstica et G. M. Pastore, « Production of R-(+)- α -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as medium », *Food Chem.*, vol. 101, n° 1, p. 345-350, janv. 2007.
- [171] G. Molina, M. R. Pimentel, et G. M. Pastore, « *Pseudomonas*: a promising biocatalyst for the bioconversion of terpenes », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, n° 5, p. 1851-1864, mars 2013.
- [172] E. Abdulmalek *et al.*, « Chemoenzymatic Epoxidation of Alkenes and Reusability Study of the Phenylacetic Acid », *The Scientific World Journal*, 2014. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/756418/>. [Consulté le: 25-janv-2018].
- [173] J. C. R. Demyttenaere, « Biotransformation of terpenoids by microorganisms », in *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 25, Part F vol., Atta-ur-Rahman, Éd. Elsevier,

2001, p. 125-178.

[174] « The Baeyer–Villiger Oxidation of Ketones and Aldehydes - Organic Reactions - Krow - Wiley Online Library ». [En ligne]. Disponible sur: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471264180.or043.03/abstract?userIsAuthenticated=false&deniedAccessCustomisedMessage=>. [Consulté le: 16-nov-2017].

[175] G. Fantin, P. P. Giovannini, A. Guerrini, S. Maietti, A. Medici, et P. Pedrini, « Enantioselective Baeyer–Villiger Oxidation of Bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-One with Fungi: Optimization of Biotransformation and Use of TiO₂ as Support of Cell Growth », *Biotechnol. Lett.*, vol. 28, n° 11, p. 805-810, juin 2006.

[176] J. H. Schrittwieser *et al.*, « Deracemization By Simultaneous Bio-oxidative Kinetic Resolution and Stereoinversion », *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, vol. 53, n° 14, p. 3731-3734, avr. 2014.

[177] V. Bódai *et al.*, « Novel Hydrolases from Thermophilic Filamentous Fungi for Enantiomerically and Enantiotopically Selective Biotransformations », *Adv. Synth. Catal.*, vol. 345, n° 6-7, p. 811-818, juin 2003.

[178] I. Lunardi, G. J. A. Conceição, P. J. S. Moran, et J. A. R. Rodrigues, « Highly stereoselective preparation of (3R,4S)-3,4-chromanediol by deracemization of (±)-3-hydroxy-4-chromanone by *Trichosporon cutaneum* », *Tetrahedron Asymmetry*, vol. 16, n° 15, p. 2515-2519, août 2005.

[179] G. J. Cardus, A. J. Carnell, H. Trauthwein, et T. Riermeir, « Microbial deracemisation of N-(1-hydroxy-1-phenylethyl)benzamide », *Tetrahedron Asymmetry*, vol. 15, n° 2, p. 239-243, janv. 2004.

[180] « Etude des réactions de réduction en chimie organique ». [En ligne]. Disponible sur: http://perso.numericable.fr/chimorga/Niveau_M1/reduc/reduc.php. [Consulté le: 16-nov-2017].

[181] K. Javidnia, E. Faghieh-Mirzaei, R. Miri, M. Attaroshan, et K. Zomorodian, « Stereoselective Reduction of Prochiral Ketones by Plant and Microbial Biocatalysts », *Indian J. Pharm. Sci.*, vol. 78, n° 1, p. 73-79, 2016.

[182] M. Trytek, K. Jędrzejewski, et J. Fiedurek, « Bioconversion of α -pinene by a novel cold-adapted fungus *Chrysosporium pannorum* », *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 42, p. 181-188, 2015.

[183] C. M. Vidya et R. Agrawal, « Production of verbenol, a high valued food flavourant from a fusant strain of *Aspergillus niger* », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 62, n° 4, p. 421-422, sept. 2003.

[184] J. D. Winkler *et al.*, « Stereoselective synthesis of a synthon for the A-ring of taxol from R-(+)-verbenone », *Tetrahedron Lett.*, vol. 36, n° 13, p. 2211-2214, mars 1995.

[185] J. L. Bicas, P. Fontanille, G. M. Pastore, et C. Larroche, « Characterization of monoterpene biotransformation in two pseudomonads », *J. Appl. Microbiol.*, vol. 105, n° 6, p. 1991-2001, déc. 2008.

[186] U. Krings, N. Lehnert, M. A. Fraatz, B. Hardebusch, H. Zorn, et R. G. Berger, « Autoxidation versus Biotransformation of α -Pinene to Flavors with *Pleurotus sapidus*: Regioselective Hydroperoxidation of α -Pinene and Stereoselective Dehydrogenation of Verbenol », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, n° 21, p. 9944-9950, nov. 2009.

[187] H. Schewe, D. Holtmann, et J. Schrader, « P450(BM-3)-catalyzed whole-cell biotransformation of alpha-pinene with recombinant *Escherichia coli* in an aqueous-organic two-phase system », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 83, n° 5, p. 849-857, juill. 2009.

[188] O. Frédéric et P. Yves, « Pharmaceuticals in hospital wastewater: Their ecotoxicity and contribution to the environmental hazard of the effluent », *Chemosphere*, vol. 115, n° Supplement C, p. 31-39, nov. 2014.

[189] M. D. Celiz, J. Tso, et D. S. Aga, « Pharmaceutical metabolites in the environment:

Analytical challenges and ecological risks », *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 28, n° 12, p. 2473-2484, déc. 2009.

[190] A. Dirany, S. E. Aaron, N. Oturan, I. Sirés, M. A. Oturan, et J. J. Aaron, « Study of the toxicity of sulfamethoxazole and its degradation products in water by a bioluminescence method during application of the electro-Fenton treatment », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 400, n° 2, p. 353-360, avr. 2011.

[191] C. D. Murphy, « Microbial degradation of fluorinated drugs: biochemical pathways, impacts on the environment and potential applications », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, n° 6, p. 2617-2627, mars 2016.

[192] H. Olvera-Vargas, S. Leroy, M. Rivard, N. Oturan, M. Oturan, et D. Buisson, « Microbial biotransformation of furosemide for environmental risk assessment: identification of metabolites and toxicological evaluation », *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 23, n° 22, p. 22691-22700, nov. 2016.

[193] S. C. Mondal, D. N. Tripathi, A. Vikram, P. Ramarao, et G. B. Jena, « Furosemide - induced genotoxicity and cytotoxicity in the hepatocytes, but weak genotoxicity in the bone marrow cells of mice », *Fundam. Clin. Pharmacol.*, vol. 26, n° 3, p. 383-392, juin 2012.

[194] F. Santos-Fo, T. P. Fill, J. Nakamura, M. R. Monteiro, et E. Rodrigues-Fo, « Endophytic fungi as a source of biofuel precursors », *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 21, n° 7, p. 728-733, juill. 2011.

[195] C. Ponzoni *et al.*, « Biotransformation of acyclic monoterpenoids by *Debaryomyces* sp., *Kluyveromyces* sp., and *Pichia* sp. strains of environmental origin », *Chem. Biodivers.*, vol. 5, n° 3, p. 471-483, mars 2008.

[196] M. J. van der Werf, J. A. M. de Bont, et D. J. Leak, « Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes », in *Biotechnology of Aroma Compounds*, Springer, Berlin, Heidelberg, 1997, p. 147-177.

[197] Y. Tian *et al.*, « The fungal leaf endophyte *Paraconiothyrium variable* specifically metabolizes the host-plant metabolome for its own benefit », *Phytochemistry*, vol. 108, p. 95-101, déc. 2014.

[198] Y. Wang et C.-C. Dai, « Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation », *Ann. Microbiol.*, vol. 61, n° 2, p. 207-215, juin 2011.

[199] K. Kikuchi, N. Matsushita, K. Suzuki, et T. Hogetsu, « Flavonoids induce germination of basidiospores of the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* », *Mycorrhiza*, vol. 17, n° 7, p. 563-570, oct. 2007.

[200] Y. (Monsanto C. Ruan, V. Kotraiah, et D. C. Straney, « Flavonoids stimulate spore germination in *Fusarium solani* pathogenic on legumes in a manner sensitive to inhibitors of cAMP-dependent protein kinase », *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI USA*, 1995.

[201] C. Werner, O. Petrini, et M. Hesse, « Degradation of the polyamine alkaloid aphelandrine by endophytic fungi isolated from *Aphelandra tetragona* », *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 155, n° 2, p. 147-153, oct. 1997.

[202] M. Zikmundová, K. Drandarov, L. Bigler, M. Hesse, et C. Werner, « Biotransformation of 2-Benzoxazolinone and 2-Hydroxy-1,4-Benzoxazin-3-one by Endophytic Fungi Isolated from *Aphelandra tetragona* », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, n° 10, p. 4863-4870, oct. 2002.

[203] Q. Yue, C. W. Bacon, et M. D. Richardson, « Biotransformation of 2-benzoxazolinone and 6-methoxy-benzoxazolinone by *Fusarium moniliforme* », *Phytochemistry*, vol. 48, n° 3, p. 451-454, juin 1998.

[204] N. Shanmugavalli, V. Umashankar, et Raheem, « Antimicrobial Activity of *Vanilla Planifolia* », *Indian J. Sci. Technol.*, vol. 2, n° 3, p. 37-40, mars 2009.

[205] S. Khoyratty *et al.*, « Fungal endophytes of *Vanilla planifolia* across Réunion Island: isolation, distribution and biotransformation », *BMC Plant Biol.*, vol. 15, juin 2015.

- [206] F. M. Cecati, C. Magallanes-Noguera, C. E. Tonn, C. E. Ardanaz, et M. Kurina-Sanz, « Ecofriendly chemical diversification of *Eupatorium buniifolium* essential oil by endophytic fungi », *Process Biochem.*, vol. 64, p. 93-102, janv. 2018.
- [207] G. M. Fortier, N. Bard, M. Jansen, et K. Clay, « Effects of tall fescue endophyte infection and population density on growth and reproduction in prairie voles. », *J. Wildl. Manag.*, vol. 64, n° 1, p. 122-128, 2000.
- [208] D. S. Hibbett, R. H. Nilsson, M. Snyder, M. Fonseca, J. Costanzo, et M. Shonfeld, « Automated Phylogenetic Taxonomy: An Example in the Homobasidiomycetes (Mushroom-Forming Fungi) », *Syst. Biol.*, vol. 54, n° 4, p. 660-668, août 2005.
- [209] T. J. White, T. D. Bruns, S. B. LEE, et J. W. Taylor, « Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics (PDF Download Available) », *ResearchGate*. [En ligne]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/223397588_White_T_J_T_D_Bruns_S_B_Lee_and_J_W_Taylor_Amplification_and_direct_sequencing_of_fungal_ribosomal_RNA_Genes_for_phylogenetics. [Consulté le: 09-mai-2017].
- [210] I. Álvarez et J. F. Wendel, « Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference », *Mol. Phylogenet. Evol.*, vol. 29, n° 3, p. 417-434, déc. 2003.
- [211] C. M. Visagie *et al.*, « Identification and nomenclature of the genus *Penicillium* », *Stud. Mycol.*, vol. 78, p. 343-371, juin 2014.
- [212] N. L. Glass et G. C. Donaldson, « Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 61, n° 4, p. 1323-1330, avr. 1995.
- [213] B. T. R. V. Brasileiro, M. R. M. Coimbra, M. Jr, M. A. De, et N. T. de Oliveira, « Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR-fingerprinting based on pcr markers », *Braz. J. Microbiol.*, vol. 35, n° 3, p. 205-210, sept. 2004.
- [214] « Memoire Online - Evaluation du diagnostic par PCR directe et PCR-Elisa sur les ITS des trypanosomes pathogènes du bétail - Bachir SOULEY KOUATO », *Memoire Online*. [En ligne]. Disponible sur: http://www.memoireonline.com/02/12/5361/m_valuation-du-diagnostic-par-PCR-directe-et-PCR-lisa-sur-les-ITS-des-trypanosomes-pathog29.html. [Consulté le: 11-mai-2017].
- [215] S. B. C., « Records of microfungi from Crete », *Bocconeia*, p. 335-350, 1996.
- [216] A. Ibrahim, D. Sørensen, H. A. Jenkins, L. Ejim, A. Capretta, et M. W. Sumarah, « Epoxynemanione A, nemanifuranones A–F, and nemanilactones A–C, from *Nemania serpens*, an endophytic fungus isolated from Riesling grapevines », *Phytochemistry*, vol. 140, p. 16-26, août 2017.
- [217] H. P. Ramos, G. H. Braun, M. T. Pupo, et S. Said, « Antimicrobial activity from endophytic fungi *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc. and *Papulaspora immersa* », *Braz. Arch. Biol. Technol.*, vol. 53, n° 3, p. 629-632, juin 2010.
- [218] J. J. de Souza, I. J. C. Vieira, E. Rodrigues-Filho, et R. Braz-Filho, « Terpenoids from Endophytic Fungi », *Molecules*, vol. 16, n° 12, p. 10604-10618, déc. 2011.
- [219] N. Eevers *et al.*, « Optimization of isolation and cultivation of bacterial endophytes through addition of plant extract to nutrient media », *Microb. Biotechnol.*, vol. 8, n° 4, p. 707-715, juill. 2015.
- [220] J. Ludwig-Müller, « Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? », *Biotechnol. Lett.*, vol. 37, n° 7, p. 1325-1334, juill. 2015.
- [221] S. Hmiri, M. Rahouti, Z. Habib, B. Satrani, M. Ghanmi, et M. E. Ajjouri, « Évaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et d'*Eucalyptus camaldulensis* dans la lutte biologique contre des champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation », *Bull. Société R. Sci. Liège*, vol. 80, p. 824-836, 2011.

- [222] A. Najjar *et al.*, « Detoxification of Toxic Phorbol Esters from Malaysian *Jatropha curcas* Linn. Kernel by *Trichoderma* spp. and Endophytic Fungi », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, n° 2, p. 2274-2288, févr. 2014.
- [223] S. Prado, D. Buisson, I. Ndoye, M. Vallet, et B. Nay, « One-step enantioselective synthesis of (4S)-isosclerone through biotransformation of juglone by an endophytic fungus », *Tetrahedron Lett.*, vol. 54, p. 1189-1191, 2013.

Auteur : MIRAL Alice

Titre: HELICHRYSUM ITALICUM ET SES MICROMYCÈTES ENDOPHYTES : DIVERSITÉ ET BIOTRANSFORMATIONS.

Directeur de thèse : VANSTEELANDT Marieke

Lieu et soutenance : Toulouse, le 2 mars 2018

RÉSUMÉ :

Helichrysum italicum, est une plante aromatique emblématique du maquis corse donnant à l'île son odeur si caractéristique. L'Hélichryse est surtout utilisée pour son huile essentielle en cosmétique et en aromathérapie.

Comme dans toutes les plantes, des micro-organismes appelés endophytes et dotés d'une puissante machinerie enzymatique y sont abrités. Ils vivent en symbiose avec leur hôte, évitant que la plante n'active ses défenses à leur égard, assurent leur propre défense et se développent à l'intérieur des plantes sans leur causer de maladies. Ils synthétisent également une large gamme de métabolites secondaires.

Durant les travaux menés en stage, huit souches d'endophytes ont été isolées et identifiées, mises en culture et incubées avec les fractions d'intérêt de l'huile essentielle afin de suivre les biotransformations médiées par ces endophytes.

ABSTRACT:

Helichrysum italicum is an emblematic aromatic plant from the Corsican bush, which gives to the island such its characteristic smell. The Corsican Helichrysum is mainly used for its essential oil in cosmetics and aromatherapy.

Like in all the plants, microorganisms called endophytes and equipped with a powerful enzymatic machinery are present in this Asteraceae. These microorganisms live in symbiosis with their hosts by building a relationship: they successfully avoid activating the host's defenses against them, they ensure their own defense and they grow inside plants without causing any harm. They are also capable of synthesizing a broad variety of secondary metabolites.

The work done during the internship permitted to isolate and identify eight strains of endophytes, cultured them and incubated them with the essential oil's fraction of interest in order to monitor the biotransformations mediated by the plant's endophytes.

Mots-clés : *Helichrysum italicum*, Immortelle, huile essentielle, endophytes, biotransformations.

Disciplines : pharmacognosie, botanique, mycologie

Intitulé et adresse de l'UFR ou du laboratoire :

Faculté des Sciences Pharmaceutiques UPS
35 Chemin des Maraîchers
31400 Toulouse
