HAL
open science

Les champignons endophytes : impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutique

Andéol Sénéquier-Crozet, Benjamin Canard

▶ **To cite this version:**

Andéol Sénéquier-Crozet, Benjamin Canard. Les champignons endophytes : impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutique. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01266084

HAL Id: dumas-01266084

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01266084v1

Submitted on 20 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UFR de Pharmacie
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

SICD1 Bibliothèques de l'UJF et de Grenoble INP

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2016 N°

LES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES : IMPACT SUR LES ECOSYSTEMES ET PRODUCTION DE MOLECULES D'INTERET THERAPEUTIQUE

THÈSE D'EXERCICE
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLÔME D'ÉTAT

Andéol SENEQUIER-CROZET **ET** **Benjamin CANARD**
Né le 08/04/1988 à Echirolles (38) **Né le 16/05/1987 à Grenoble (38)**

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Le 18 Janvier 2016

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Président du jury :
Docteur Lucile SAGE, Docteur en Pharmacie, HDR, Université Joseph Fourier

Directeur de thèse :
Docteur Bello MOUHAMADOU, HDR, Maître de Conférences, Université Joseph Fourier

Membres :
Docteur Marie-Noëlle BINET, Maître de Conférences, Université de Bourgogne
Docteur Florence SOUARD, Maître de Conférences, Université Joseph Fourier
Docteur Bernard CHAMPON, Docteur en Pharmacie

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

LISTE DES ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Affaire suivie par Lanto FAURE NEUHAUSER,

Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr

Assistante du Doyen

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directrice des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

(Année 2015-2016 : liste mise à jour le 12/11/2015)

STATUT	NOM	PRENOM	DEPARTEMENT*	LABORATOIRE
MCU	ALDEBERT	Delphine	D4	LAPM - UMR CNRS 5163
PU-PH	ALLENET	Benoit	D5	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
PU	BAKRI	Aziz	D5	TIMC-IMAG CNRS UMR 5525
MCU	BATANDIER	Cécile	D1	LBFA - INSERM U1055
MCU-PH	BEDOUCH	Pierrick	D5	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
MCU	BELAIDI-CORSAT	Elise	D5	HP2 - INSERM U1042
MAST	BELLET	Béatrice	D5	-
ATER	BOUCHERLE	Benjamin	D3	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	BOUMENDJEL	Ahcène	D3	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
DCE	BOURDIER	Guillaume	D5	HP2
MCU	BOURGOIN	Sandrine	D1	IAB - CRI INSERM UJF U823
MCU	BRETON	Jean	D1	L.C.I.B. - UMR E3 CEA UJF
MCU	BRIANCON-MARJOLLET	Anne	D5	HP2 - INSERM U1042
MCU	BUDAYOVA SPANO	Monika	D4	IBS - UMR 5075 CEA CNRS UJF
PU	BURMEISTER	Wim	D4	UVHCI - UMI 3265 UJF EMBL CNRS

MCU-PH	BUSSER	Benoit	D1	IAB - CRI INSERM UJF U823
Professeur Emérite	CALOP	Jean	D5	-
MCU	CAVAILLES	Pierre	D1	LAPM – UMR 5163 CNRS UJF
AHU	CHANOINE	Sébastien	D5	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
MCU	CHOISNARD	Luc	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
AHU	CHOVELON	Benoit	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU-PH	CORNET	Murielle	D4	THEREX – TIMC IMAG UMR 5525 CNRS UJF
DCE	CRESPO-YANEZ	Xenia	D1	LBGE
PU-PH	DANEL	Vincent	D5	SMUR SAMU
PU	DECOUT	Jean-Luc	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	DELETRAZ- DELPORTE	Martine	D5	Equipe SIS -EAM 4128 UCB
MCU	DEMEILLIERS	Christine	D1	LBFA - INSERM U1055
PU	DROUET	Christian	D4	AGIM - CNRS 3405
PU	DROUET	Emmanuel	D4	UVHCI - UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
MCU	DURMORT - MEUNIER	Claire	D1	I.B.S – UMR 5075 CEA UJF CNRS
PU-PH	FAURE	Patrice	D1	HP2- INSERM U1042
PRCE	FITE	Andrée	D6	-
AHU	GARNAUD	Cécile	D4	THEREX – TIMC IMAG UMR 5525 NCRS UJF
PRAG	GAUCHARD	Pierre-Alexis	D2	-
MCU-PH	GERMI	Raphaëlle	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
MCU	GEZE	Annabelle	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	GILLY	Catherine	D3	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	GODIN-RIBUOT	Diane	D5	HP2- INSERM U1042
PRCE	GOUBIER MATHYS	Laurence	D6	-
Professeure Emérite	GRILLOT	Renée	D4	-
MCU	GROSSET	Catherine	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	GUIEU	Valérie	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	HININGER-FAVIER	Isabelle	D1	LBFA - Inserm U1055
MCU	JOYEUX-FAURE	Marie	D5	HP2- INSERM U1042
MCU	KHALEF	Nawel	D5	TIMC-IMAG CNRS UMR 5525
ATER	KOTZKI	Sylvain	D5	HP2- INSERM U1042
MCU	KRIVOBOK	Serge	D3	LCBM, IRTSV CEA
PU	LENORMAND	Jean Luc	D1	THEREX, TIMC-IMAG
DCE	LUNVEN	Laurent	D3	DCM
DCE	MARILLIER	Mathieu		HP2
PU	MARTIN	Donald	D1	TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF CNRS
MCU	MELO DE LIMA	Christelle	D4	L.E.C.A – UMR CNRS 5553
PU	MOINARD	Christophe	D1	LBFA - Inserm U1055
DCE	MONTEMAGNO	Christopher	D1	LRB
PU-PH	MOSSUZ	Pascal	D4	THEREX - TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCU	MOUHAMADOU	Bello	D3	L.E.C.A – UMR CNRS 5553
DCE	MOULIN	Sophie		HP2

DCE	NGUYEN	Kim-Anh	D3	DPM
MCU	NICOLLE	Edwige	D3	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
DCE	OUIDIR	Marion		IAB
MCU	OUKACINE	Farid	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	PERES	Basile	D3	DPM- UJF/CNRS UMR 5063
DCE	PERONNE	Lauralie		IAB
DCE	PETIT	Pascal	D1	TIMC
MCU	PEUCHMAUR	Marine	D3	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	PEYRIN	Éric	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	RACHIDI	Walid	D1	L.C.I.B - UMR E3 CEA/UJF
MCU	RAVELET	Corinne	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	RIBUOT	Christophe	D5	HP2- INSERM U1042
PAST	RIEU	Isabelle	D5	-
Professeure Emérite	ROUSSEL	Anne -Marie	D1	-
PU-PH	SEVE	Michel	D1	CR INSERM / UJF U823 Institut Albert Bonniot
MCU	SOUARD	Florence	D3	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
ATER	TAHMASEBI	Faezeh		TIMC-IMAG
MCU	TARBOURIECH	Nicolas	D4	UVHCI, UMR 3265 UJF-EMBL- CNRS
DCE	TODOROV	Zlatomir	D1	
DCE	TRABOULSI	Wael		BCI
PAST	TROUILLER	Patrice	D5	-
DCE	VACHEZ	Yvan		CRI-GIN

*
D1 : Département « Mécanismes Biologiques des maladies et des Traitements (DMBMT)»
D2 : Département «Bases Physicochimiques du médicament »
D3 : Département «Origine, Obtention et Optimisation des Principes Actifs des Médicaments »
D4 : Département « Bases immunologiques, Hématologiques et Infectieuses des Maladies et Médicaments associés »
D5 : Département « Médicaments et Produits de Santé »
D6 : Département « Anglais »

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
CRI : Centre de Recherche INSERM **CNRS** : Centre National de Recherche Scientifique
DCE : Doctorants Contractuels Enseignement **DPM :** Département de Pharmacochimie Moléculaire et de Cognition et Ontogenèse »
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot,
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Roget
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
MCU : Maitre de Conférences des Universités
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers **PAST :** Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
PU : Professeur des Universités
PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
UMR: Unité Mixte de Recherche
UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interaction

REMERCIEMENTS

Nous tenions à remercier chaleureusement…

Le **Dr. Bello Mouhamadou** pour son encadrement, le partage de son expertise, ainsi que sa sympathie. Nous avons apprécié travailler sous ta direction.

Madame le **Dr. Lucile Sage**, pour avoir accepté de présider notre jury

Mesdames les **Dr. Florence Souard** et **Dr. Marie-Noëlle Binet** et Monsieur le **Dr. Bernard Champon** d'avoir accepté de constituer notre jury. Nous sommes tout particulièrement reconnaissants envers mesdames **Souard** et **Binet** qui ont accepté de se déplacer de loin à l'occasion de la soutenance de cette thèse d'exercice.

Tout le personnel contribuant au fonctionnement de la faculté de Pharmacie de Grenoble. Nous garderons un très bon souvenir de ces années de formation.

Remerciements d'Andéol :

A Benjo pour les bons moments que nous avons passés à rédiger cette thèse d'exercice.

A mes chers parents. A ma fratrie, mes belles sœurs, neveux et nièces.

A ma marraine, Florence et mon parrain, Benoît. A tout le reste de ma famille, mes cousins, cousines. Une pensée à ma grand-mère Marie-José.

A mes amis. Je sais que mon expérience Canadienne ne nous éloignera que géographiquement.

A mes employeurs et collègues de travail avec lesquels je n'ai eu que des expériences enrichissantes (Grande pharmacie normale, pharmacie de l'alliance, pharmacie des grands boulevards, pharmacie du caducée et pharmacie de la fontaine).

Remerciements de Benjamin :

A Ded, pour les bons moments que nous avons passés à rédiger cette thèse d'exercice.

A Eléonore qui m'apporte tant et qui m'a toujours soutenu.

A ma famille qui a toujours cru en moi.

A mes amis.

A toute l'équipe de la pharmacie des Charmettes qui m'a tant appris.

SOMMAIRE

LISTE DES ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE **2**
REMERCIEMENTS **5**
SOMMAIRE **6**
TABLE DES ILLUSTRATIONS **9**
DÉFINITIONS **11**
ACRONYMES **11**
INTRODUCTION **12**
PREMIERE PARTIE : CARACTERISTIQUES GENERALES DU REGNE FONGIQUE **14**
1. Mycologie générale 14
2. Phylogénie 15
2.1. Microsporidia 16
2.2. Chytridiomycota 16
2.3. Glomeromycota 17
2.4. Zygomycota 17
2.5. Dikarya 17
2.5.1. Ascomycota *17*
2.5.2. Basidiomycota *18*
3. Modes de vie 18
3.1. Le saprophytisme 19
3.2. Le parasitisme 19
3.3. Le symbiotisme 19
3.4. L'endophytisme 21
DEUXIEME PARTIE : LES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES ET LEURS CLASSES DE METABOLITES SECONDAIRES **22**
1. Historique des publications sur les champignons endophytes 22
2. Définition 23
3. Caractéristiques générales 23
4. Classification des champignons endophytes 25
4.1. Les endophytes de classe 1 26
4.1.1. Position phylogénétique *26*
4.1.2. Caractéristiques du mode de vie endophytique *26*
4.2. Les endophytes des autres classes 29
4.2.1. Classe 2 ..... *29*
4.2.1.1. Position phylogénétique 29
4.2.1.2. Caractéristiques du mode de vie endophytique 30
4.2.2. Classe 3 ..... *30*
4.2.2.1. Position phylogénétique 30
4.2.2.2. Caractéristiques du mode de vie endophytique 30
4.2.3. Classe 4 ..... *31*

4.2.3.1. Position phylogénétique 31
4.2.3.2. Caractéristiques du mode de vie endophytique 31
5. Les métabolites secondaires des champignons endophytes 32
5.1. Les alcaloïdes 33
5.2. Les terpènes et terpénoïdes 34
5.3. Les polycétides 37
5.4. Peptides non ribosomiques 38
TROISIEME PARTIE : LES MOLECULES D'INTERET THERAPEUTIQUE PRODUITES PAR LES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES 40
1. Molécules d'intérêt thérapeutique 40
1.1. La camptothécine 41
1.1.1. Classe de métabolite secondaire 41
1.1.2. Classe thérapeutique 41
1.1.3. Champignon endophyte/plante hôte 41
1.1.4. Rôle pour le champignon endophyte ou la plante hôte 42
1.1.5. Propriétés pharmacologiques 44
1.1.6. Degré d'exploitation 46
1.2. L'ergotamine 48
1.2.1. Classe de métabolite secondaire 48
1.2.2. Classe thérapeutique 48
1.2.3. Champignon endophyte/plante hôte 48
1.2.4. Rôle pour le champignon endophyte ou la plante 48
1.2.5. Propriétés pharmacologiques 49
1.2.6. Degré d'exploitation 52
1.3. La Lovastatine 53
1.3.1. Classe de métabolite secondaire 53
1.3.2. Classe thérapeutique 53
1.3.3. Champignon endophyte/plante hôte 53
1.3.4. Rôle pour le champignon endophyte ou la plante 53
1.3.5. Propriétés pharmacologiques 54
1.3.6. Degré d'exploitation 56
1.4. Le paclitaxel (Taxol®) 58
1.4.1. Classe de métabolite secondaire 58
1.4.2. Classe thérapeutique 58
1.4.3. Champignon endophyte/plante hôte 59
1.4.4. Rôle pour le champignon endophyte ou la plante 59
1.4.5. Propriétés pharmacologiques 59
1.4.6. Degré d'exploitation 62
2. Utilisation des champignons endophytes comme producteurs de molécules d'intérêt 63
2.1. Contexte 63
2.2. Principe 64

2.3. Limites 65
2.4. Améliorations/perspectives 66
2.4.1. Mutagenèse 67
2.4.2. Ingénierie génétique 67
2.4.3. Optimisation des paramètres de fermentation 67
2.4.4. Utilisation des éliciteurs 68
2.4.5. Utilisation des précurseurs 69
2.4.6. Co-culture 69
QUATRIEME PARTIE : L'ENDOPHYTISME DES CHAMPIGNONS ET LES ECOSYSTEMES 71
1. Régulation du mutualisme 71
1.1. Régulation enzymatique : les NADPH oxydases et la « proteine stress activated » kinase A 71
1.2. Plasticité génétique : l'exemple de la résistance aux dérivés de la camptothécine 73
2. Impact environnemental des endophytes 74
2.1. Impact des endophytes de classe 1 74
2.1.1.1. Conséquences phénotypiques sur l'hôte 77
2.1.1.2. Conséquences sur les plantes environnantes 78
2.1.1.3. Conséquences sur les animaux et les microorganismes de l'environnement 79
2.2. Les endophytes non issus des Clavicipitaceae (classes 2, 3 et 4) 83
2.2.1. Endophytes de classe 2 83
2.2.2. Endophytes de classe 3 84
2.2.3. Endophytes de classe 4 84
3. Limites du modèle : les champignons endophytes, des mutualistes ? 84
CONCLUSION : 86
ANNEXES 89
REFERENCES 93
RESUME 102

TABLE DES ILLUSTRATIONS

- **Liste des figures :**

Figure 1 : Classification phylogénétique du monde vivant 14
Figure 2 : Classification phylogénétique du règne Fungi 15
Figure 3 : Cycle d'une espèce de microsporidie, *Encephalitozoon intestinalis* contaminant les entérocytes 16
Figure 4 : Les modes de vie des champignons 18
Figure 5 : Les différents types de mycorhizes 20
Figure 6 : Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes hôtes 23
Figure 7 : Modes de transmission observés chez les champignons endophytes : l'exemple du cycle d'Epichloë festucae 25
Figure 8 : Les classes d'endophytes selon la localisation des tissus colonisés 26
Figure 9 : *Neotyphodium coenophialum* colonisant *Festuca arundinacea* 28
Figure 10 : Les principales voies des métabolites secondaires fongiques 33
Figure 11 : Voie de biosynthèse simplifiée des alcaloïdes indoliques 34
Figure 12 : Voie de synthèse des terpènes chez les champignons 36
Figure 13 : Représentation du gène de la PKS 37
Figure 14 : Structure d'un polycétide d'intérêt thérapeutique : la lovastatine 38
Figure 15 : Représentation schématique d'une NRPS 39
Figure 16 : Hypothèses sur la synthèse de camptothécine par les champignons endophytes 43
Figure 17 : Fonctionnement de la Topoisomérase 1 45
Figure 18 : Blocage de la réplication et formation de cassure double par stabilisation du complexe topo1-ADN clivé 46
Figure 19 : Site d'action des médicaments antimigraineux 49
Figure 20 : Structure de l'ergotamine et de la sérotonine 50
Figure 21 : Métabolisme du mévalonate 54
Figure 22 : Résumé de l'effet pléiotrope des statines 56
Figure 23 : Structure du paclitaxel 58
Figure 24 : Le paclitaxel stabilise la formation des microtubules au profit de la forme tubuline 60
Figure 25 : Devenir d'une cellule en présence d'une molécule antimitotique comme le paclitaxel 61
Figure 26 : Approche rationnelle permettant d'optimiser la production de métabolites secondaires par les champignons endophytes 66
Figure 27 : Rôle du complexe NOXA/B et de la protéine SAKA dans le maintien de l'association mutualiste 71
Figure 28 : La plante *Camptotheca acuminata*, naturellement productrice de camptothécine 73
Figure 29 : L'impact des champignons endophytes de classe 1 sur deux voies métaboliques : la voie de l'acide jasmonique et la voie de l'acide salicylique 80
Figure 30 : Les champignons, une existence, plusieurs mode de vie 85
Figure 31 : Les champignons endophytes et l'écosystème 85

- **Liste des tableaux :**

Tableau 1 : La classification des endophytes fongiques.....25
Tableau 2 : Subdivisions des endophytes de classe 1.....27
Tableau 3 : Répartition des terpénoïdes d'intérêt thérapeutique selon leur structure 37
Tableau 4 : Exemples de polycétides d'intérêt thérapeutique 38
Tableau 5 : Principaux endophytes produisant la camptothécine.....42
Tableau 6 : Exemple de champignons endophytes produisant le paclitaxel 59
Tableau 7 : Marché mondial des molécules d'intérêt produites par les endophytes 64
Tableau 8 : Rendement de production du paclitaxel par des souches fongiques 65
Tableau 9 : Diminution de la production des métabolites secondaires par les champignons endophytes après plusieurs repiquages.....66
Tableau 10 : Impact de la mutagénèse sur le rendement de production.....67
Tableau 11 : Impact des paramètres de fermentation sur le rendement de production 68
Tableau 12 : impact des éliciteurs sur le rendement de production.....69
Tableau 13 : Impact de la co-culture sur le rendement de production 70
Tableau 14 : Les dérivés de l'ergoline (dérivés clavines, dérivés de l'ergot) et leurs bioactivités.....75
Tableau 15 : Les indoles-diterpènes et leurs bioactivités 76
Tableau 16 : La bioactivité de la peramine.....76
Tableau 17 : La bioactivité des dérivés lolines.....77
Tableau 18 : Les syndromes toxiques majeurs induits par des champignons endophytes observés en particulier dans l'élevage 82

- **Liste des Annexes :**

Annexe 1 : Biosynthèse des alcaloïdes clavines et des alcaloïdes dérivés de l'ergot 89
Annexe 2 : Biosynthèse des indoles-diterpènes 90
Annexe 3 : Biosynthèse des pyrrolopyrazines.....91
Annexe 4 : Biosynthèse des alcaloïdes de type loline 92

DÉFINITIONS

- Allélopathique : ensemble de plusieurs interactions biochimiques directes ou indirectes, positives ou négatives, d'une plante sur une autre au moyen le plus souvent de métabolites secondaires
- Anamorphe : la forme asexuée d'une espèce de champignon
- Culture axénique : culture dépourvue de toute contamination
- Epiphyte : un microorganisme qui vit à la surface d'une plante. Ne réfère pas à un mode de nutrition
- Hyphe : structure filamenteuse constituant la forme végétative du champignon
- Mycélium : masse d'hyphes formant l'appareil végétatif du champignon
- Propagule : organe de dissémination (propagation) et de reproduction
- Scale-up : ou montée en échelle en français, correspond au passage d'une production à petite échelle à une production industrielle
- Sclérote : structure dure, forme de résistance
- Stroma : structure compacte sur laquelle se forment les fructifications (sexuées et asexuées)
- Téléomorphe : la forme sexuée d'une espèce de champignon

ACRONYMES

- 5-HT : 5-hydroxy-tryptamine
- AcetylCoA : Acetyl coenzyme A
- ACP : Acylcarrier protein
- AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien
- AMM : Autorisation de mise sur le marché
- AT : Acyltransferase
- ATC : Anatomique thérapeutique chimique
- CYC : Cyclase
- DES : Diéthylsulfate
- DES : Diéthylsulfate
- DH : Déshydratase
- DSE : Dark septate endophyte = endophyte de classe 4
- EMS : Méthanesulfonate d'éthyle
- EMS : Méthanesulfonate d'éthyle
- eNOS : NO synthases endothéliales
- ER : Enoylreductase
- FPP : Farnesylpyrophosphate
- GGPP : Geranylgeranylpyrophosphate
- HIF : Facteur induit par l'hypoxie
- HMGCoA : Hydroxyméthylglutaryl-CoA
- IPP : Isopentyl pyrophosphate
- KR : Kétoreductase
- KS: KétoCoA synthase
- MAP Kinase : Mitogen activated pathway kinase
- MT : Méthyltransférase
- NO : Monoxyde d'azote
- NOX : NADPH oxydase
- NRPS : Non ribosomal peptid synthase
- NTG : N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
- NTG : N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
- PDA : Milieu potatoes dextrose agar
- PKS : Polyketide synthase
- SAK : Stress activated kinase
- STR : Strictosidine synthase
- TE : Thioestérase
- TOP1css : Topoisomérase 1 clivage complexe
- Topo1 : Topoisomérase I
- TS : Taxadiene synthase
- TS : Taxadiene synthas

INTRODUCTION

Le terme endophyte vient du grec. Etymologiquement, il signifie « à l'intérieur d'une plante ». Il a été employé et défini pour la première fois en 1866 comme un organisme colonisant asymptomatiquement un végétal (1). Les champignons endophytes constituent un groupe polyphylétique très diversifié, principalement constitué d'espèces appartenant au phylum Ascomycota. Toutes les plantes dans les écosystèmes naturels semblent établir des relations avec des champignons endophytes. L'existence de ces champignons est connue depuis la fin du 19ème siècle (2). Les premiers fossiles d'endophytes remontent aux temps où les plantes supérieures sont apparues sur terre (3).

Depuis les cinquante dernières années, des publications se sont progressivement intensifiées, mais c'est à partir de la fin du 20ème siècle que les champignons endophytes ont réellement attiré l'attention avec la découverte de la production de l'anti-cancéreux paclitaxel (médicament blockbuster) par un endophyte *Taxomyces andreanae* (4). La littérature scientifique sur les champignons endophytes se focalise en particulier sur deux aspects :

- pharmacologique : les endophytes ont la capacité de produire de nombreuses molécules bioactives dont certaines possèdent des propriétés thérapeutiques utilisables contre de très nombreuses maladies (5) (6) ;

- écologique : la phylogénie des endophytes et de leurs hôtes, les interactions entre le champignon endophyte et la plante hôte, l'impact de ces champignons endophytes sur la diversité végétale et le fonctionnement des écosystèmes.

Une famille de champignons attire tout particulièrement l'attention : la famille des Clavicipitaceae. Elle constitue majoritairement un groupe de champignons parasites de plantes, d'insectes ou d'autres champignons, mais elle comporte également un certain nombre d'espèces capables d'endophytisme. Ces dernières font l'objet de nombreuses études en raison de leur importance économique liée à leur capacité de produire de nombreux métabolites secondaires bioactifs et de leur importance écologique.

L'objectif de cette thèse est de réaliser un état de l'art sur les champignons endophytes afin de mieux cerner leur influence sur le fonctionnement des écosystèmes et d'étudier leurs potentialités remarquables à produire des molécules d'intérêt thérapeutique. Dans le premier chapitre, nous décrirons les caractéristiques générales du règne fongique avec en particulier la phylogénie et le mode de vie des champignons. Dans le second chapitre, nous aborderons la

classification des endophytes et décrirons les métabolites secondaires produits par ces endophytes ainsi que leurs principales voies métaboliques. Dans le troisième chapitre, nous aborderons les aspects thérapeutiques en nous focalisant sur quatre molécules à forte valeur ajoutée décrites comme étant produites par des champignons endophytes. Nous indiquerons pour chacune d'entre elles, sa classe chimique et thérapeutique, l'espèce du champignon endophyte productrice, l'espèce de la plante hôte, ses propriétés pharmacologiques ainsi que son niveau d'exploitation. Les aspects biotechnologiques permettant l'optimisation de la production de ces molécules d'intérêt thérapeutique seront également traités. Enfin dans le quatrième chapitre, nous décrirons les impacts des endophytes sur les écosystèmes à travers leur influence sur les plantes hôtes, les plantes environnantes, les animaux et les microorganismes.

PREMIERE PARTIE : CARACTERISTIQUES GENERALES DU REGNE FONGIQUE

1. Mycologie générale

Le règne des champignons ou règne Fungi regroupe entre 3,5 et 5,1 millions d'espèces selon une estimation datant de 2005 (7). Près de 100 000 espèces sont décrites, ce qui représente environ 2,5% de leur nombre total. Les champignons constituent un règne à part entière, au même titre que les animaux, les plantes, les protistes, les archéobactéries et les eubactéries (Figure 1).

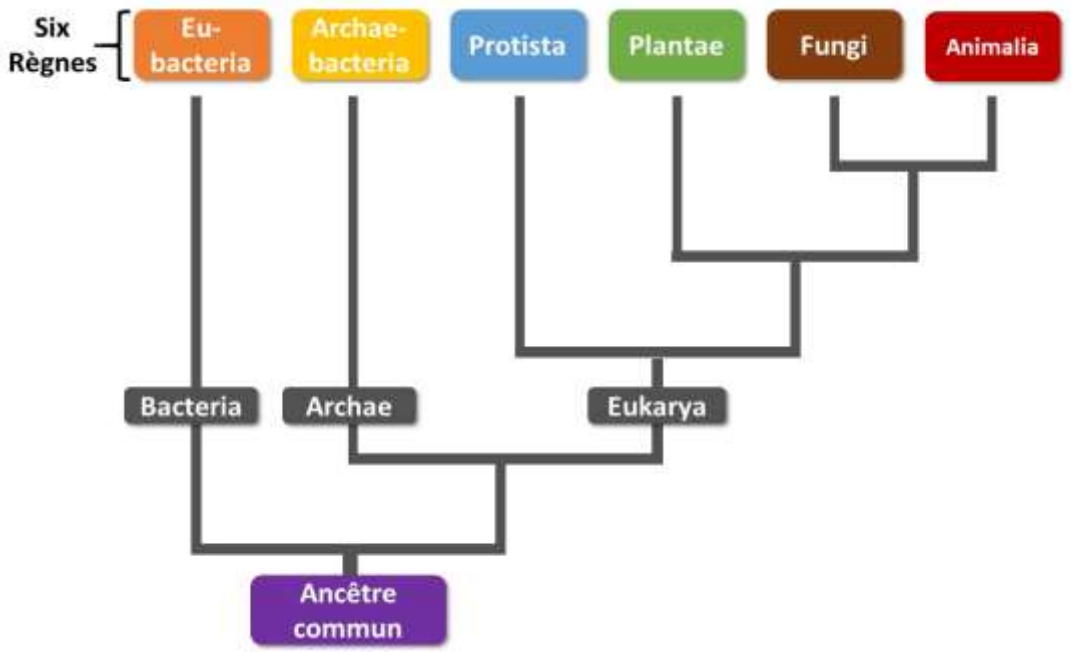


Figure 1 : Classification phylogénétique du monde vivant

Les champignons possèdent un appareil végétatif simple ou thalle. Ils se caractérisent par la présence d'une paroi cellulaire contenant de la chitine et des β-glucanes et par la faible différenciation de leurs cellules.

Contrairement aux végétaux, les champignons sont hétérotrophes. Ils sont incapables de synthétiser de la matière organique à partir de substances inorganiques. Ils sont obligés de recycler des composés organiques préexistants comme source d'énergie et de carbone. Cette

caractéristique les a conduits à adopter plusieurs modes de vie : saprophytisme, parasitisme, symbiotisme et endophytisme.

2. Phylogénie

La classification des champignons a connu de nombreuses modifications depuis 1950 en intégrant notamment le concept évolutionniste par l'intermédiaire du cladisme. Les marqueurs utilisés pour classer les espèces relèvent non seulement des caractères macroscopiques, mais également de la biochimie et de la génétique.

La nouvelle classification a considérablement simplifié le règne des champignons. Il ne contient désormais que des organismes dépourvus de phase amiboïde. Ainsi, le règne des champignons est subdivisé en cinq phyla : **Microsporidia**, **Chytridiomycota**, **Glomeromycota**, **Zygomycota** et **Dikarya (Ascomycota et Basidiomycota)** (Figure 2).

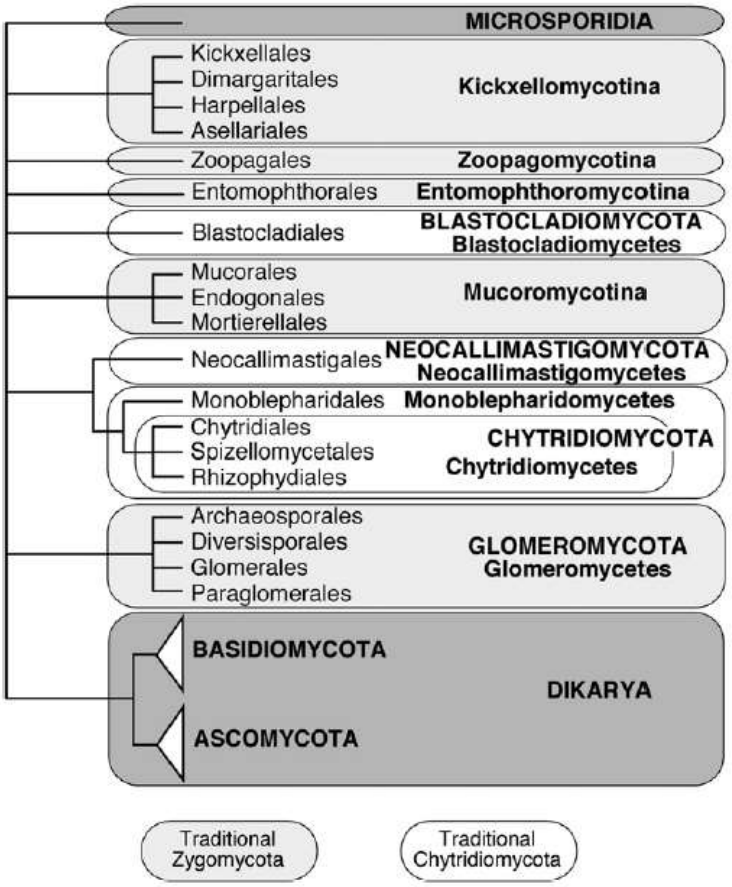


Figure 2 : Classification phylogénétique du règne Fungi (8)
Les Chytridiomycota et les Zygomycota sont actuellement considérés comme polyphylétiques.

2.1. Microsporidia

Ce phylum comprend approximativement 1300 espèces décrites (9). Il regroupe des organismes unicellulaires, parasites intracellulaires obligatoires des vertébrés et des invertébrés. Chez l'humain, ils sont principalement responsables de maladies opportunistes dont la première a été décrite en 1985 (10). Les microsporidies sont caractérisées par l'émission d'un « tube polaire » qui émerge de la spore pour infiltrer la cellule hôte (Figure 3).

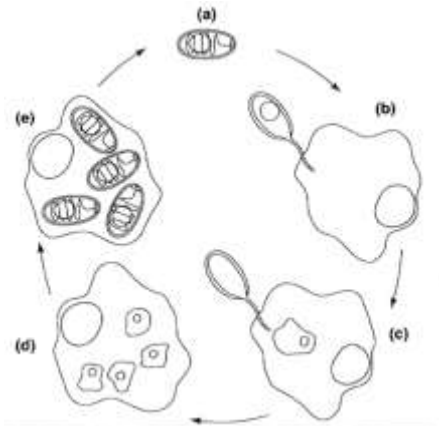


Figure 3 : Cycle d'une espèce de microsporidie, *Encephalitozoon intestinalis* contaminant les entérocytes (11)
(a) Spore de Encephalitozoon intestinalis. (b) Emission du « tube polaire ». (c) Pénétration dans la cellule hôte. (d) et (e) Multiplication et développement de nouvelles spores d'Encephalitozoon intestinalis dans le cytoplasme jusqu'à la lyse de la cellule hôte.

2.2. Chytridiomycota

Ce phylum comprend approximativement 1000 espèces décrites (12). Il regroupe des champignons primitifs, caractérisés par un thalle unicellulaire ou filamenteux siphonné et des spores mobiles flagellées. Selon la nouvelle classification, ce phylum est considéré comme polyphylétique et regroupe les Blastocladiomycota, les Neocallimastigomycota, les Monoblepharidomycota et les espèces qui étaient rangées dans les Chytridiomycota selon l'ancienne classification (8).

2.3. Glomeromycota

Initialement inclus dans les Zygomycota, ils constituent désormais un phylum à part entière. Les espèces le composant présentent un mode de vie symbiotique : elles établissent une association par mycorhize arbusculaire avec l'hôte. Contrairement aux Zygomycota, ils sont décrits comme exclusivement capables de reproduction asexuée. Cependant, de récentes études mettent en lumière de nombreux gènes impliqués dans le mécanisme de la méiose et conservés dans leur génome, ce qui soutiendrait la persistance d'une reproduction sexuée cryptique (13). Composés d'environ 200 espèces décrites (14), ils représentent une petite part de la diversité des champignons mais jouent un rôle écologique très important : l'ordre des Glomérales par exemple établit une relation symbiotique par endomycorhize avec plus de 90% des espèces de plantes terrestres (15).

2.4. Zygomycota

Ce phylum regroupait approximativement 1065 espèces décrites (16) caractérisées par des thalles filamenteux siphonnés et des spores dépourvues de flagelle. Ce phylum est désormais considéré comme polyphylétique et regroupe les Kickxellomycotina, les Zoopagomycotina, les Entomophthoromycotina et les Mucormycotina (8).

2.5. Dikarya

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

2.5.1. Ascomycota

Les Ascomycota sont composés d'environ 64 000 espèces décrites (16). Ils possèdent des thalles unicellulaires ou pluricellulaires filamenteux septés. Ils forment en cas de reproduction sexuée des cellules différenciées appelées asques, qui, après caryogamie, puis méiose, produisent des spores (ascospores).

2.5.2. Basidiomycota

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

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

3. Modes de vie

Toutes les espèces de champignons sont absorbotrophes. L'alimentation se fait par absorption transmembranaire d'oligo-éléments, de sels ou de molécules organiques par transport actif ou par diffusion passive. Plusieurs modes de vie découlant de cette caractéristique sont ainsi observés (Figure 4).

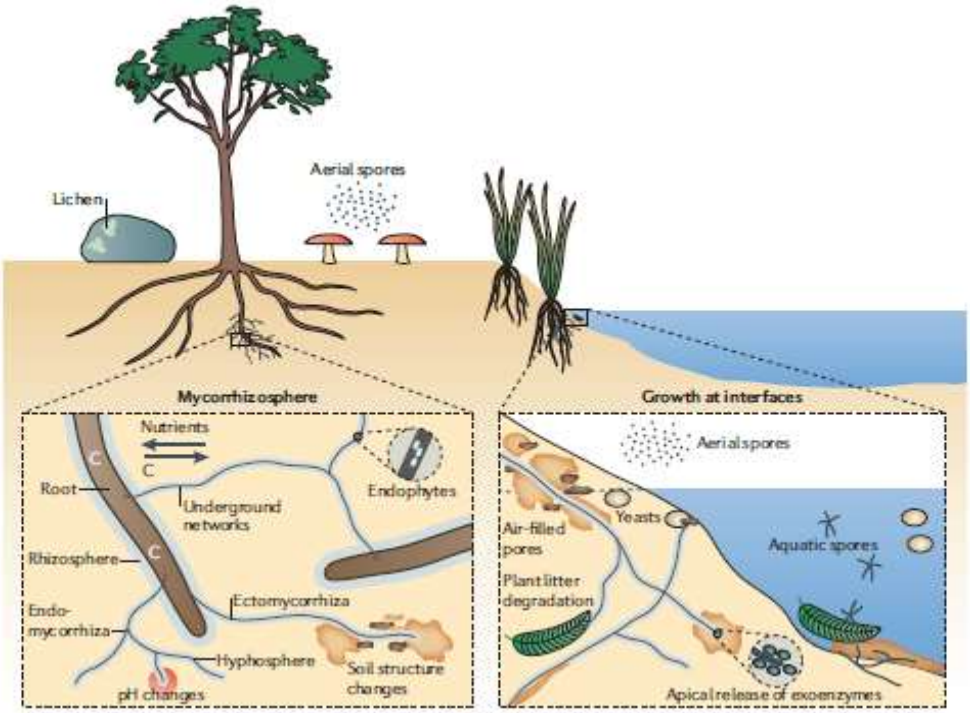


Figure 4 : Les modes de vie des champignons (17)

3.1. Le saprophytisme

Le saprophytisme se caractérise par la capacité d'un être vivant de se nourrir à partir de matière organique morte, dont il absorbe les éléments nutritifs prédigérés grâce à l'excrétion d'enzymes extracellulaires. Les champignons saprophytes, en décomposant la litière organique, produisent l'humus.

La plupart des champignons dits « épiphytiques » retrouvés à la surface de la plupart des plantes supérieures (phylloplane) et de la litière organique, sont des saprophytes généralistes. Lors de la sénescence de ces plantes, les épiphytes saprophytes finissent par pénétrer la plante pour la décomposer (18).

3.2. Le parasitisme

Le parasitisme par les champignons se caractérise par la capacité d'un individu issus du règne Fungi, de tirer des éléments nutritifs provenant d'un autre organisme. Cette interaction se fait au détriment de l'organisme parasité, qui est alors victime de symptômes du fait de la présence du parasite. Le parasitisme est délétère pour l'hôte et indispensable pour le parasite. Les champignons parasites peuvent être nécrotrophes ou biotrophes.

3.3. Le symbiotisme

Le symbiotisme caractérise une relation durable, voire indispensable et mutuellement bénéfique entre au moins deux êtres vivants, appelés symbiotes. Un exemple de symbiotisme développé par les champignons est l'association mycorhizienne. Les champignons utilisent les éléments nutritifs carbonés provenant de la photosynthèse et en retour, participent à la nutrition hydrominérale de la plante. Le symbiotisme mycorhizien est présent chez environ 95% des plantes vasculaires. Il en existe deux principaux grands types (Figure 5) :

- La symbiose ectomycorhizienne qui se caractérise par la formation du réseau de Hartig : réseau hyphal à la surface racinaire des plantes colonisées, servant de matrice d'échanges entre la plante et le champignon. Le champignon reste exclusivement extracellulaire.

- La symbiose endomycorhizienne, qui se caractérise par la formation de structures intracellulaires : les arbuscules qui sont des matrices d'échanges entre la plante hôte et le champignon et les vésicules qui sont des structures de stockage fongique. Ces dernières ne sont pas présentes dans toutes les espèces endomycorhiziennes.

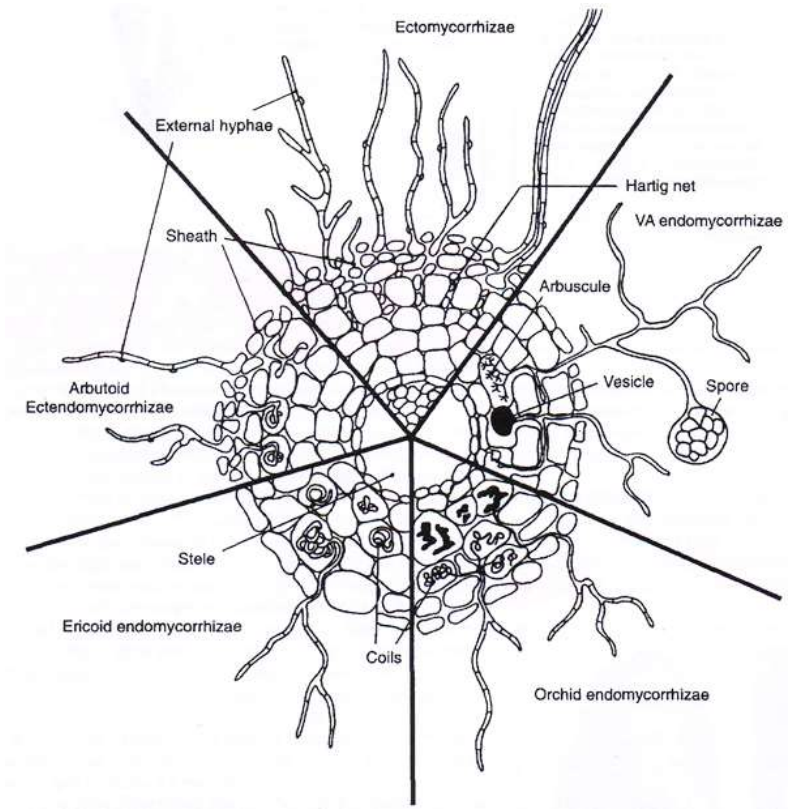


Figure 5 : Les différents types de mycorhizes (19)

Quelques familles de plantes vasculaires n'établissent pas d'association mycorhizienne, il s'agit des Crucifères, des Chénopodiacées, des Amaranthacées, des Cypéracées, des Urticacées, des Juncacées et de quelques Caryophyllacées (20).

En plus des avantages nutritifs, les champignons mycorhiziens confèrent à leur hôte une protection contre :

- les stress biotiques : principalement par une augmentation de la production des hormones (phytoalexines) par la plante hôte, en réponse à la pénétration du champignon mycorhizien (21).
- les stress abiotiques : par une diminution de la résistance au transfert de l'eau dans leurs racines mycorhizées et par le maintien de la turgescence de leurs cellules grâce au meilleur prélèvement de composés osmotiques (22) (23).

3.4. L’endophytisme

L’endophytisme est un mode de vie pouvant être adopté par certains champignons, se caractérisant par la colonisation des structures internes d’une plante de manière asymptomatique. Ce mode de vie fait l’objet de notre travail de recherche bibliographique.

DEUXIEME PARTIE : LES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES ET LEURS CLASSES DE METABOLITES SECONDAIRES

1. Historique des publications sur les champignons endophytes

Nous avons sélectionné ces quatre dates que nous considérons comme des tournants dans la recherche sur les champignons endophytes.

1. Introduction du terme « endophyte » (1) (**De Bary**, 1866).

   A. De Bary définit le terme endophyte comme toute infection asymptomatique d'une plante par un microorganisme. L'étymologie de ce mot provient du grec ancien : endo « dans », φυτόν « végétal », littéralement « à l'intérieur d'un végétal ».

2. *« Sur la présence d'un champignon dans l'ivraie »* (2) (**Guerin**, 1898).

   P. Guérin décrit la présence asymptomatique d'un champignon dans l'ivraie (Poaceae du genre *Lolium*).

3. *Neotyphodium coenophialum* et intoxications massives dans l'élevage (24) (**Bacon et al.** 1977).

   C. W. Bacon et son équipe attribuent à *Neotyphodium coenophialum* la production de toxines responsables des intoxications massives (syndrome du pied de fétuque ou « foot fescue syndrome ») observées dans l'élevage.

4. *Taxomyces andreanae* producteur du paclitaxel (4) (**Stierle et al.** 1993).

   A. Stierle et son équipe découvrent qu'un champignon endophyte colonisant l'if, *Taxomyces andreanae,* est producteur du paclitaxel (Taxol®) : anticancéreux déjà naturellement produit par l'if, générant plus d'un milliard d'euros chaque année depuis sa mise sur le marché par Bristol-Myers-Squibb en 1992.

2. Définition

L'endophytisme des champignons est une interaction biologique qui se caractérise par le fait, pour un individu issu du règne Fungi, de coloniser l'intérieur d'un organisme végétal, de manière asymptomatique. Il est parfois retrouvé dans la littérature, que l'endophytisme donne systématiquement lieu à une interaction biologique mutuellement positive ou à défaut, au moins non délétère pour la plante hôte, auquel cas cette interaction pourrait être qualifiée de mutualisme. A la différence de la symbiose, l'endophytisme n'est pas une interaction systématiquement durable.

3. Caractéristiques générales

Les champignons endophytes sont majoritairement issus du phylum Ascomycota (25) et présentent une grande diversité. Ils sont hétérotrophes et prélèvent des nutriments à l'hôte sans que celui-ci ne présente de quelconques signes de maladie. Ils peuvent croître dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire (Figure 6).

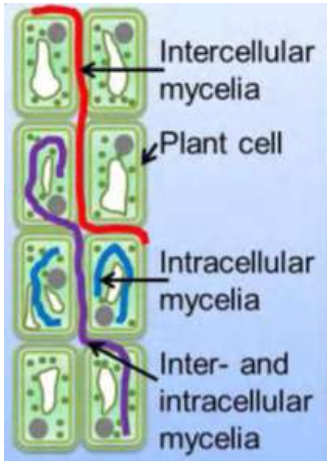


Figure 6 : Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes hôtes (5)

Les champignons endophytes sont ubiquistes : ils ont été détectés dans pratiquement toutes les espèces de plantes (26), à toutes les latitudes (25). Une même espèce de champignon endophyte est capable de coloniser plusieurs hôtes différents.

Deux modes de transmission sont observés chez les champignons endophytes (Figure 7) : le mode de transmission est le moyen par lequel le champignon endophyte peut coloniser un autre individu végétal à partir de l'hôte initial :

- La transmission verticale

  Elle se caractérise par la colonisation d'un nouvel hôte progéniture de l'hôte primaire. Elle procède de la pénétration d'une hyphe de champignon endophyte dans une graine, un grain de pollen (27) ou une propagule de la plante hôte. Elle permet ainsi la contamination de la descendance de l'hôte primaire. Le champignon endophyte reste génétiquement identique (propagation par reproduction asexuée) mais il peut s'implanter soit dans un clone (colonisation d'une propagule), soit dans un hôte génétiquement différent, issu d'une nouvelle génération (colonisation d'un grain de pollen ou d'une graine).

  La transmission verticale par la graine a principalement été observée chez quelques espèces de champignons endophytes de la famille des Clavicipitaceae qui colonisent les Poaceae, les Cypéraceae et les Juncaceae. Nous verrons cependant qu'elle existe chez d'autres espèces d'endophytes ayant été observés comme pouvant coloniser plusieurs espèces non graminoïdes (*Pinus* spp., *Vigna unguiculata*, *Theobroma cacao*, *Castanea* spp., *Colophospermum mopane*) (28).

- La transmission horizontale

  Elle se caractérise par la colonisation d'un nouvel hôte n'ayant la plupart du temps pas de lien avec l'hôte primaire. Elle procède de la dissémination de spores par un vecteur de dispersion. Après germination, l'hyphe pénètre le nouvel hôte soit par les stomates, soit par pénétration directe au travers de l'épiderme. La plupart des espèces d'endophytes, colonisant la plus grande partie des végétaux présentent ce mode de transmission. Les spores peuvent être issues de la reproduction sexuée ou asexuée du champignon.

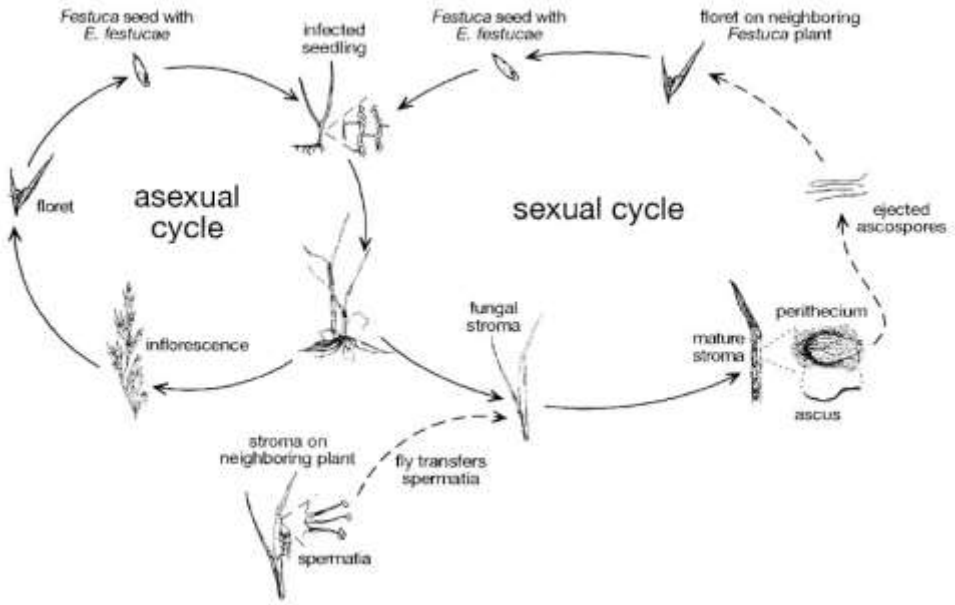


Figure 7 : Modes de transmission observés chez les champignons endophytes : l'exemple du cycle d'Epichloë festucae (29)
Cycle de vie du champignon endophyte Epichloë festucae colonisant la plante Festuca arundinaceae : la fétuque élevée. Ici, le cycle asexué correspond à une transmission verticale : le mycélium du champignon endophyte présent dans l'hôte pénètre dans la graine portée par la plante. La graine est disséminée, germe et forme un nouvel individu végétal, progéniture de l'hôte primaire qui est colonisé à son tour par le champignon. Le cycle sexué correspond à une transmission horizontale : le champignon endophyte 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 être disséminée et germer.

4. Classification des champignons endophytes

Les endophytes sont actuellement divisés en 4 classes (Tableau 1) (30) selon la famille de l'endophyte concerné, la localisation dans les tissus de l'hôte (Figure 8) et le mode de transmission.

Tableau 1 : La classification des endophytes fongiques (30)

Table 1 Symbiotic criteria used to characterize fungal endophytic classes

	Clavicipitaceous	Nonclavicipitaceous		
Criteria	Class 1	Class 2	Class 3	Class 4
Host range	Narrow	Broad	Broad	Broad
Tissue(s) colonized	Shoot and rhizome	Shoot, root and rhizome	Shoot	Root
In planta colonization	Extensive	Extensive	Limited	Extensive
In planta biodiversity	Low	Low	High	Unknown
Transmission	Vertical and horizontal	Vertical and horizontal	Horizontal	Horizontal
Fitness benefits*	NHA	NHA and HA	NHA	NHA

*Nonhabitat-adapted (NHA) benefits such as drought tolerance and growth enhancement are common among endophytes regardless of the habitat of origin. Habitat-adapted (HA) benefits result from habitat-specific selective pressures such as pH, temperature and salinity.

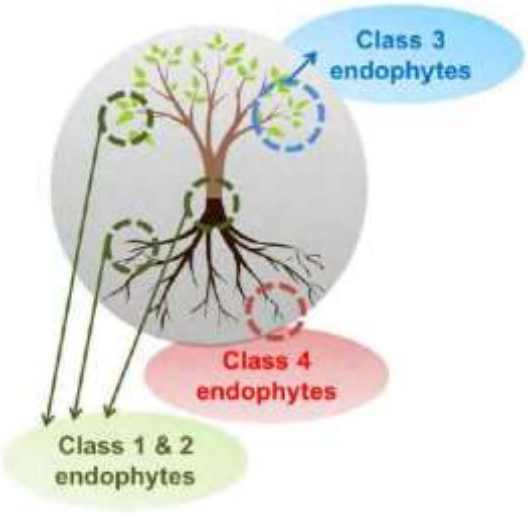


Figure 8 : Les classes d'endophytes selon la localisation des tissus colonisés (5)

4.1. Les endophytes de classe 1

Ils sont constitués par des champignons appartenant à la famille des Clavicipitaceae (Ascomycota) qui regroupe des champignons essentiellement parasites de plantes, d'insectes ou autres (31). Cette famille est constituée actuellement de 37 genres (32) dont quatre possèdent des espèces capables d'endophytisme : *Balansia, Ephelis, Epichloë* et *Neotyphodium* (33). Nous laisserons de côté l'endophytisme des espèces des genres *Balansia* et *Ephelis*, peu documenté.

4.1.1. Position phylogénétique

La position phylogénétique de cette famille est la suivante :

Fungi ; Dikarya; Ascomycota; Saccharomyceta; Pezizomycotina; Leotiomyceta; Sordario myceta; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales ; Clavicipitaceae (32)

4.1.2. Caractéristiques du mode de vie endophytique

Les endophytes issus des Clavicipitaceae, sont des champignons colonisant un spectre étroit d'hôtes, restreint aux plantes herbacées des familles Poaceae, Juncaceae et Cypéraceae.

Les champignons capables d'endophytisme ne représentent qu'une petite partie des Clavicipitaceae. Ils sont majoritairement issus des genres *Epichloë* et *Neotyphodium* et colonisent les parties aériennes ainsi que le rhizome des plantes hôtes. Les racines ne sont pas colonisées. Ils forment des infections systémiques intercellulaires, dans le milieu apoplastique (34) (30). Les mycéliums ne sont que très rarement trouvés dans le faisceau vasculaire de l'hôte (35).

Le genre *Epichloë* comporte :

- des espèces exclusivement parasites,
- des espèces endophytes pouvant devenir parasites selon les conditions environnementales et l'état physiologique de l'hôte.

Le genre *Neotyphodium*, dont les espèces sont de type mutualiste, est constitué d'anamorphes qui étaient initialement classés dans le genre *Acremonium*, mais suite à une révision taxonomique le genre a été créé (36). Certains d'entre eux possèdent une forme téléomorphe qui les rattache au genre *Epichloë*.

Les endophytes de classe 1 sont subdivisés en trois types selon leur mode de transmission et l'interaction établie avec l'hôte (29) (Tableau 2).

Tableau 2 : Subdivisions des endophytes de classe 1 (29)

	Symptomatic (Type I)	Mixed (Type II)	Asymptomatic (Type III)
Fungus:			
Reproduction	Sexual	Both	Clonal
Transmission	Horizontal	Both	Vertical
Propagule	Ascospores	Both	Seeds
Host:			
Reproduction	Sterile/clonal	Partial sterility	Sexual
Interaction	Pathogenic	Intermediate	Mutualistic
Infection frequency	Low-moderate	Intermediate	High
Taxonomy	Entire grass family	C3 pooid grasses	C3 pooid grasses

Les types I et II sont constitués par le genre *Epichloë*. L'infection par le champignon, après une phase asymptomatique, peut finir par provoquer des symptômes délétères sur l'hôte, lorsque le champignon atteint sa forme de reproduction sexuée et interrompt la floraison de la plante.

Lors de cette reproduction sexuée, le champignon produit un stroma puis des structures de reproduction sexuée sur la tige de la plante hôte. Ce stroma va interrompre la formation de l'inflorescence de l'hôte et donc sa capacité à produire des graines. Cependant, certaines espèces d'*Epichloë* n'empêchent pas totalement la production de graines : le stroma occupant partiellement la tige de la plante, la floraison et donc la production de graines peut se dérouler partiellement.

Les espèces d'*Epichloë* sont capables de transmission horizontale par reproduction sexuée et asexuée, mais aussi selon les cas, de transmission verticale par reproduction asexuée, lorsqu'il subsiste une formation de graines chez l'hôte (25) ou que le cycle est strictement endophytique.

Il existe par ailleurs un mécanisme d'hybridation interspécifique végétative chez les espèces d'*Epichloë* et de *Neotyphodium*. Celui-ci se produit lorsque deux mycéliums d'espèces différentes fusionnent. Il y a donc une phase hétérocaryotique, puis après caryogamie et méiose une phase homocaryotique. Les hybrides peuvent recombiner ou fusionner les caractéristiques des génomes de leurs parents, mais aussi développer de nouvelles capacités (37). Une caractéristique de ces hybrides est la présence de gènes surnuméraires dans leur génome (redondances) (38). Ces recombinaisons interspécifiques permettent de maintenir un brassage génétique en l'absence de reproduction sexuée.

Le type III est constitué par le genre *Neotyphodium* (Figure 9). Il colonise son hôte de manière asymptomatique quel que soit le stade de développement de la plante. Souvent, le champignon est présent dans le primordia ce qui favorise sa transmission par la graine.

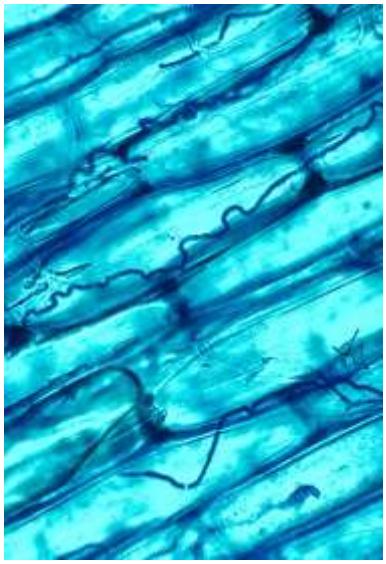


Figure 9 : *Neotyphodium coenophialum* colonisant *Festuca arundinacea* (39)

Les espèces du genre *Neotyphodium* ont perdu leur capacité de reproduction sexuée. Une hypothèse évoque que l'origine évolutive de ce genre serait un hybride de deux souches d'*Epichloë*, qui serait inapte à la formation du stroma précédant sa reproduction sexuée (38). La contamination d'une graine par cette souche hybride d'*Epichloë* aurait permis la contamination d'une progéniture de la plante hôte (transmission verticale) et ainsi la dissémination du mutant.

C'est ce qui fait toute la particularité de l'endophytisme de type III. Les espèces anamorphiques du genre *Neotyphodium*, incapables de reproduction sexuée, ne profitent plus du brassage génétique pour enrichir leur génome. La viabilité du champignon résulterait uniquement de l'hybridation interspécifique végétative (parasexualité) et de la sélection du meilleur hybride par la plante hôte. La dominance de la transmission verticale permettrait donc une sélection naturelle du mutualisme le plus performant (38).

Il est également évoqué que des espèces du genre *Neotyphodium* seraient capables d'une transmission horizontale asexuée, bien que cette dernière tiennent une importance mineure par rapport à la transmission verticale. Le cycle de vie des champignons endophytes issus des Clavicipitaceae n'est pas encore totalement élucidé (40).

Le mode de transmission seul ne permet pas de prédire les bénéfices éventuels conférés à la plante ainsi que la longévité des associations mutualistes (30).

4.2. Les endophytes des autres classes

4.2.1. Classe 2

4.2.1.1. Position phylogénétique

Les endophytes de classe 2 sont tous issus de Dikarya. Ils sont en majorité constitués d'Ascomycota (uniquement des Pezizomycotina), mais ils comprennent également quelques représentants des Basidiomycota (Agaricomycotina, Pucciniomycotina) (30).

4.2.1.2. Caractéristiques du mode de vie endophytique

Les champignons endophytes de classe 2 présentent un spectre d'hôte large. Ils peuvent coloniser toutes les parties de la plante et croissent de manière extensive dans le milieu intercellulaire principalement (30).

La transmission est le plus souvent verticale, mais il y a parfois transmission horizontale, en particulier lorsque l'hôte est en sénescence : le champignon émerge de l'hôte et sporule. Certains de ces endophytes sont également saprophytes et peuvent coloniser le sol (30).

Ils ont la particularité, dans le cadre de leur mutualisme, de fournir des avantages à l'hôte dits « habitats adaptés ». C'est-à-dire qu'ils apportent à l'hôte un avantage lié à une spécificité de l'habitat à l'origine d'un stress. La fréquence de colonisation des hôtes en milieux à haut stress abiotique pour l'hôte est très importante (90-100%) (30).

Il est intéressant de noter que les endophytes de classe 2 sont souvent cultivables et peuvent croître sur plusieurs milieux de culture (30).

4.2.2. Classe 3

4.2.2.1. Position phylogénétique

Ils sont tous issus de Dikarya. Ils sont en majorité constitués d'Ascomycota, en particulier les Pezizomycotina, (familles des Sordariomyceta, Dothideomyceta, Pezizomyceta, Leotiomyceta et Eurotiomyceta). On trouve également des Basidiomycota, plus souvent présents dans les tissus ligneux que dans les tissus foliaires (30) (41).

4.2.2.2. Caractéristiques du mode de vie endophytique

Le spectre des hôtes est très large. Les individus de cette classe peuvent coloniser, en grand nombre, les parties aériennes d'une plante mais de manière très localisée. Ainsi, chaque hôte peut présenter une grande diversité d'individus, d'espèces différentes (jusqu'à une

centaine d'espèces) (38). Les feuilles des plantes tropicales sont particulièrement colonisées par ces espèces (30). Leur transmission est strictement horizontale, en particulier lorsque l'hôte est en sénescence : le champignon émerge et produit des spores sexuées ou asexuées (30).

4.2.3. Classe 4

4.2.3.1. Position phylogénétique

Leur position phylogénétique n'est pas encore clairement établie. Ils appartiendraient aux Ascomycota du sous-embranchement des Pezizomycotina : en particulier les ordres des Pleosporales, Pezizales et Helotiales (42).

4.2.3.2. Caractéristiques du mode de vie endophytique

Les endophytes de classe 4 présentent un spectre d'hôte large, bien qu'on les retrouve souvent associés à des arbustes ou arbres, en particulier les espèces de conifères (30). Ils ne colonisent uniquement que les racines de la plante, de manière extensive. Ils sont caractérisés par la nature de leurs hyphes. Ces dernières sont septées et de couleur sombre de par la présence de mélanine. Ce sont les Dark Septate Endophyte (DSE). Dans les racines, ces champignons forment de façon occasionnelle des micro-sclérotes et pour certaines espèces une structure similaire au réseau de Hartig, structure formée par les champignons ectomycorhiziens (30).

Ils colonisent asymptomatiquement les milieux intra- et extracellulaires de l'hôte. Ils sont présents principalement dans le cortex de la racine (42). Ils semblent se reproduire par reproduction asexuée principalement (conidies et croissance/fragmentation mycélienne). Le mode de transmission est strictement horizontal (30).

Ils ont un rôle particulièrement important dans les milieux arides, semi-arides, alpins ou subalpins (environnement à haut-stress abiotique) (42). Ils sont ubiquitaires du point de vue du biotope et se retrouvent dans le monde entier (30). Ils ont une importance similaire à celle des mycorhizes : leur distribution est large et leur taux de colonisation est important (42). Ils peuvent coloniser des plantes mycorhizées ou non. Les plantes qui présentent ces endophytes de classe 4 peuvent également être colonisées par des endophytes foliaires (30).

5. Les métabolites secondaires des champignons endophytes

Un métabolite secondaire est généralement défini par opposition à un métabolite primaire qui intervient dans le fonctionnement vital d'un organisme. Les acides nucléiques et les acides aminés sont deux exemples de métabolites primaires. Les métabolites secondaires ne sont pas impliqués de façon directe dans le développement ou la reproduction de l'organisme, mais procurent à l'organisme un avantage généralement écologique.

Si certaines de ces molécules peuvent avoir un intérêt thérapeutique pour l'homme, le rôle des métabolites secondaires chez le champignon endophyte est diversifié, on y retrouve par exemple des toxines et des phytohormones.

Les métabolites secondaires des champignons endophytes sont très variés. Les classes chimiques les plus retrouvées sont les alcaloïdes, les peptides non ribosomiques, les polycétides et les terpènes (43), (44). Les terpènes sont synthétisés à partir du mévalonate, les polycétides ont pour origine le malonylCoA (malonyl Coenzyme A), les alcaloïdes et les peptides utilisent des acides aminés (Figure 10).

Les principaux systèmes enzymatiques producteurs de métabolites secondaires des champignons endophytes sont donc les polycétides synthases (PKS pour polyketide synthase en anglais), les non ribosomal peptid synthases (NRPS), et les enzymes responsables de la synthèse d'alcaloïdes indoliques (43) (45).

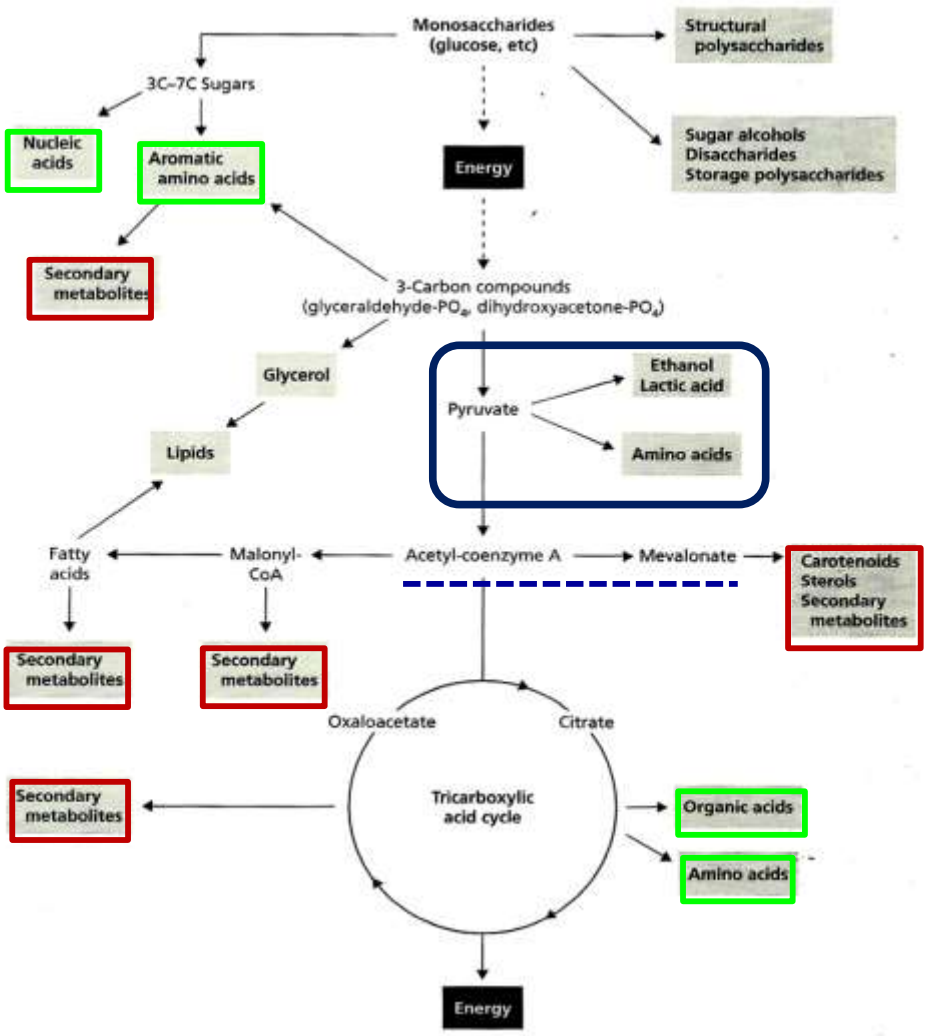


Figure 10 : Les principales voies des métabolites secondaires fongiques (46)

5.1. Les alcaloïdes

Il s'agit d'une classe hétérogène caractérisée par la présence d'une fonction basique azotée généralement incluse dans un hétérocycle (47). Les alcaloïdes ont une activité pharmacologique significative et sont majoritairement dérivés des acides aminés. Ils proviennent du métabolisme de l'ornithine, de la lysine, de la phénylalanine, de la tyrosine, du tryptophane, de l'arginine, de la proline, de l'acide anthranilique et de l'histidine.

On peut classer les alcaloïdes en 3 groupes (47) :

- les alcaloïdes vrais : synthétisés à partir d'acides aminés, ils ont leur atome d'azote inclus dans un hétérocycle,

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

L'hétérocycle de l'alcaloïde provient d'un acide aminé. Chaque acide aminé peut être à l'origine d'un ou plusieurs types d'hétérocycles azotés.

L'une des voies de synthèses principales de métabolites secondaires des champignons est celle qui vise à produire des alcaloïdes indoliques (alcaloïdes vrais) (43). Cette voie permet aux champignons endophytes, à partir du tryptophane, de produire les molécules d'intérêt thérapeutique majeur que sont par exemple la vinblastine (Figure 11) et la vincristine (deux puissants anticancéreux) ou encore de produire des composés toxiques pour les animaux (dérivés de l'ergot, toxique pour le bétail) (48).

Il existe également d'autres voies comme par exemple celles qui proviennent de la proline et de l'arginine et permettent aux champignons endophytes de synthétiser respectivement les pyrrolizidines (lolines) et les pyrrolopyrazines (peramine) (49) (50).

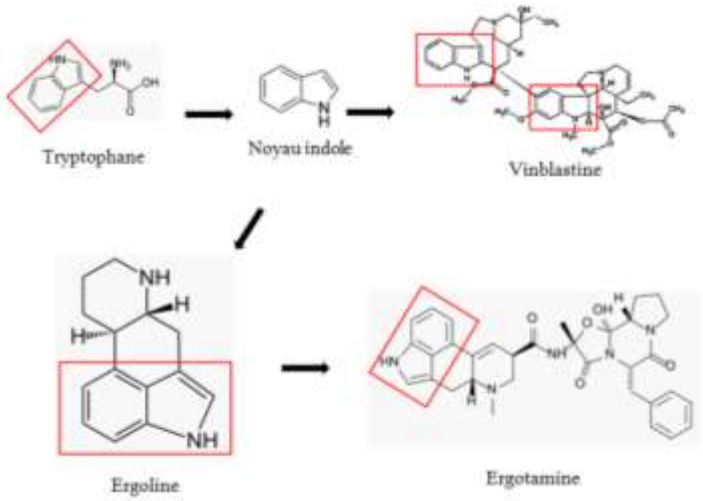


Figure 11 : Voie de biosynthèse simplifiée des alcaloïdes indoliques

5.2. Les terpènes et terpénoïdes

Les terpènes sont une classe d'hydrocarbures produits à partir d'Isopentyl PyroPhosphate (IPP). Leur squelette carboné est composé de plusieurs unités isoprènes (diène

composé de 5 carbones), qui mises bout-à-bout, forment une molécule pouvant être cyclique ou linéaire. Les terpènes sont classés selon leur nombre d'unités pentacarbonées (n) :

n = 2 monoterpène ; n = 3 sesquiterpène ; n = 4 diterpènes ; n = 5 sesterterpènes ; n = 6 triterpènes ; n = 8 tetraterpènes ; n > 8 polyterpènes

La synthèse des terpènes commence par la formation d'acide mévalonique à partir de 2 unités d'acétylCoenzyme A (acetylCoA). L'acide mévalonique va ensuite être phosphorylé puis décarboxylé pour former de l'IPP, précurseur des terpènes (Figure 12).

Les terpénoïdes ont des structures analogues aux terpènes (structure isoprène multiple de 5 carbones) mais ne sont pas des hydrocarbures. Ils possèdent des atomes d'oxygènes donnant lieu à des groupements alcools ou cétones par exemple.

Ils sont classés de la même façon que les terpènes selon le nombre d'unité pentacarbonées (n), mais le suffixe « oïde » est ajouté à la fin du nom. Par exemple pour un terpénoïdes possédant 3 unités pentacarbonées (n = 3) on parle de « sesquiterpenoïde ».

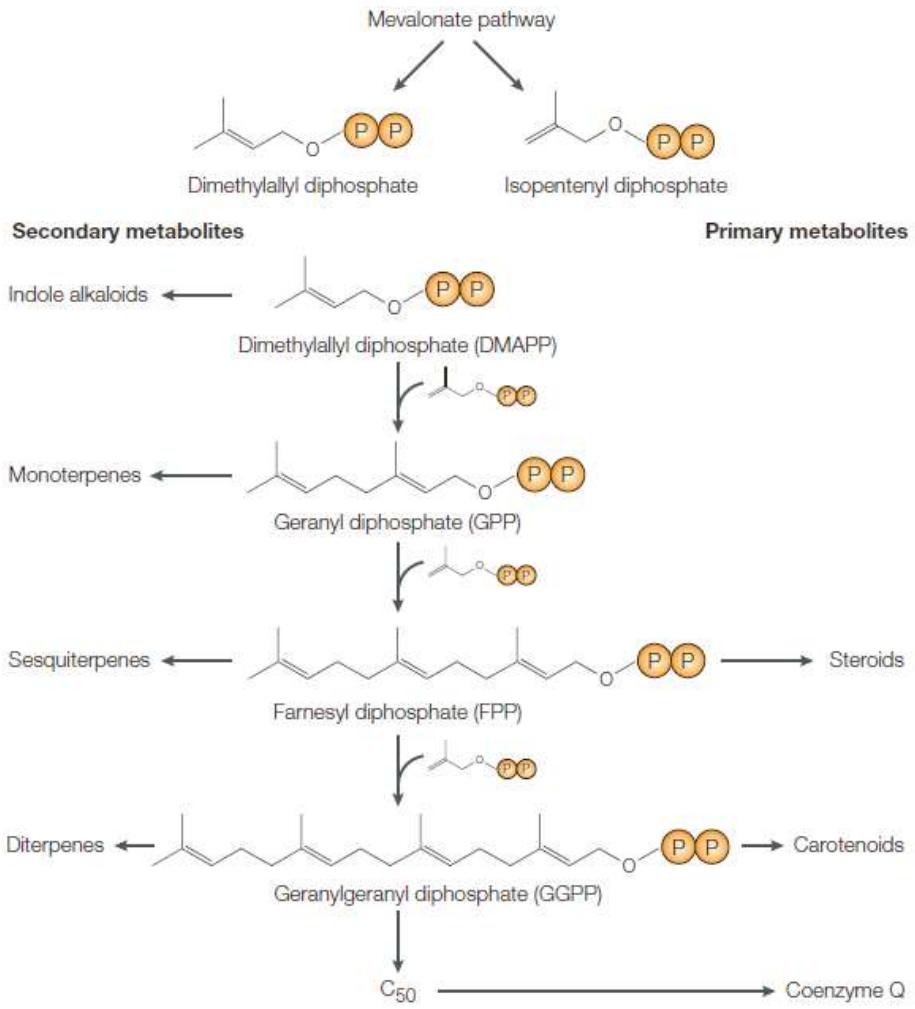


Figure 12 : Voie de synthèse des terpènes chez les champignons (73)

On retrouve parmi les terpénoïdes remarquables produits par des champignons endophytes les dérivés de l'acide gibbérellique, produit notamment par l'espèce *Aspergillus fumigatus*, endophyte du soja (51). Ces composés sont regroupés sous le terme de gibbérellines. Ce sont des phytohormones qui provoquent une élongation cellulaire au niveau de l'entre-nœud, une croissance des tiges, des pousses et des fruits et induisent la germination ainsi que la floraison des plantes. On les utilise pour augmenter la taille des fruits et leur teneur en sucre (52).

Une équipe de recherche brésilienne a recensé chez des champignons endophytes 127 terpénoïdes possédant des activités pharmacologiques (Tableau 3). D'après cette étude, les terpénoïdes isolés seraient majoritairement des sesquiterpénoïdes (53).

Tableau 3 : Répartition des terpénoïdes d'intérêt thérapeutique selon leur structure (53)

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

5.3. Les polycétides

Les polycétides (ou polyacétates) sont une classe de métabolites secondaires que l'on retrouve chez les bactéries, les champignons et les plantes. Leurs structures et leurs fonctions sont très diverses, beaucoup possèdent des activités pharmacologiques.

Les polycétides sont les métabolites secondaires les plus fréquents chez les champignons (45). Dans ces organismes, ils sont synthétisés par des polycétides synthases de type I. Il s'agit d'une protéine multi-domaine. Certains domaines sont obligatoires au fonctionnement de la protéine et se retrouvent chez tous les champignons : c'est le cas de la KétoCoA synthase (KS), l'acyltransférase (AT) et de l'acyl carrier protein (ACP). Les autres domaines sont facultatifs et ne sont pas présents chez tous les champignons : la Kétoreductase (KR), la déshydratase (DH), l'énoyl réductase (ER), la méthyltransférase (MT), une cyclase (CYC), une thioestérase (TE) (Figure 13).

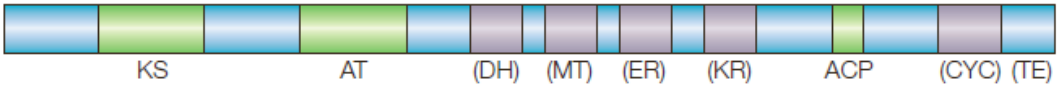


Figure 13 : Représentation du gène de la PKS (73)
En vert les domaines constants de l'enzyme, en violet les domaines optionnels.

La synthèse des polycétides s'apparente à celle des acides gras (45). Elle consiste en la condensation d'unité acétylCoA et malonylCoA conduisant à des chaînes carbonées longues, de taille variable. La différence entre la synthèse des acides gras et celle des polycétides est que

la condensation des unités malonyl CoA peut être suivie d'une réduction du carbone placé en position β alors que cette réduction est systématique dans le cas de la synthèse des acides gras. De nombreuses molécules d'intérêt thérapeutique (Tableau 4) (Figure 14) proviennent de cette voie générale de synthèse.

Tableau 4 : Exemples de polycétides d'intérêt thérapeutique

Molécule	**Classe thérapeutique**	**Champignon**	**Plante hôte**
Lovastatine (54)	Statine	*Aspergillus niger PN2*	*Taxus baccata*
Codinaeopsine (55)	Anti-paludéen	*Codinaeopsis gonytrichoides*	*Vochysia guatemalensis*
Acide cytosporique (56)	Anti-VIH, inhibiteur des intégrases	*Cytospora* sp.	*Ilex canariensis*(57)

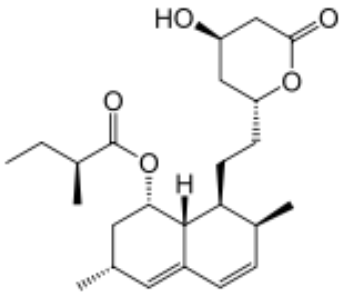


Figure 14 : Structure d'un polycétide d'intérêt thérapeutique : la lovastatine

5.4. Peptides non ribosomiques

Les peptides non ribosomiques sont des métabolites secondaires que l'on retrouve chez les bactéries et les champignons (58). Ils sont synthétisés par des NRPS qui sont de grands complexes enzymatiques multi-domaines. Cette synthèse ne nécessite pas d'ARN messager et utilise à la fois des acides aminés protéinogènes (intervenant dans la synthèse protéique) ainsi que des acides aminés non protéinogènes (qui sont souvent des acides aminés protéinogènes

phosphorylés, méthylés, hydroxylés…). Les NRPS sont composés de 2 à 20 modules environ, chaque module ayant pour fonction d'ajouter un monomère (acide aminé). Il y a trois types de modules : module d'initiation (ajout du premier acide aminé), d'élongation (ajout du deuxième acide aminé jusqu'à l'avant dernier) et de terminaison (ajout du dernier acide aminé et libération du peptide). Chacun de ces modules est composé par plusieurs domaines : adénylation (activation du monomère), thiolation (élongation de la chaîne peptidique), condensation (formation des liaisons peptidiques) ; le module de terminaison possède en plus un domaine thioestérase (libération du peptide) (58) (Figure 15).

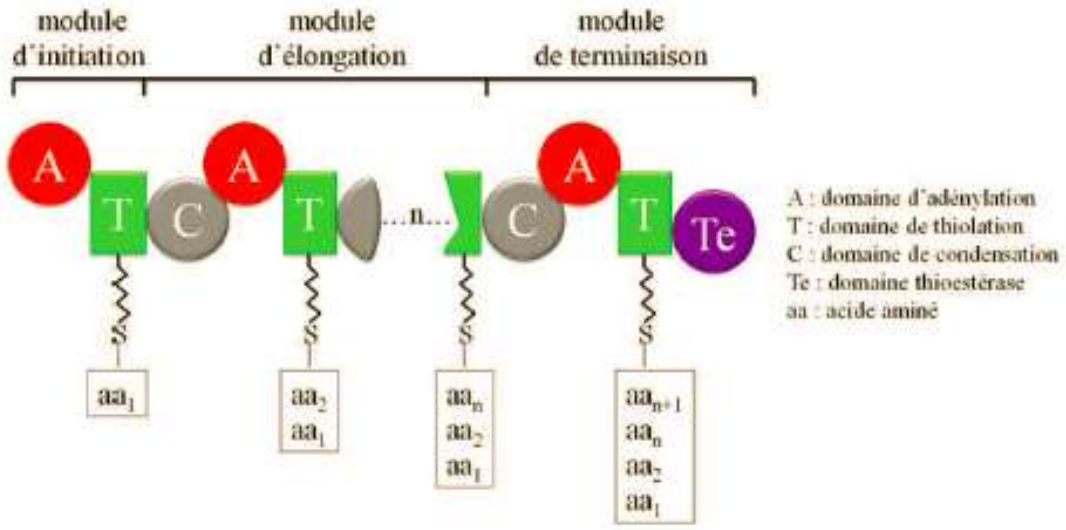


Figure 15 : Représentation schématique d'une NRPS

De nombreux peptides non ribosomiques d'intérêt pharmaceutique sont produits par des champignons endophytes comme par exemple la cryptocandine A (antimycosique) décrite chez *Cryptosporiopsis cf. quercina* (59).

TROISIEME PARTIE : LES MOLECULES D'INTERET THERAPEUTIQUE PRODUITES PAR LES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES

Les champignons endophytes sont capables de produire des molécules d'intérêt thérapeutique très diverses tant sur le plan chimique que sur le plan de leurs activités. Nous retrouvons des alcaloïdes, des polycétides, des terpènes. Ces molécules possèdent un spectre d'activité pharmacologique très large. Nous retrouvons (60) :

- des anticancéreux
- des antimigraineux
- des antibiotiques
- des antidépresseurs
- des antidiabétiques
- des anti-inflammatoires
- des immunosuppresseurs
- des hypolipémiants

Ces molécules sont synthétisées à partir des métabolites primaires au travers de voies métaboliques bien définies : ce sont des métabolites secondaires.

1. Molécules d'intérêt thérapeutique

Nous avons limité notre étude à 4 types de molécules possédant une forte valeur ajoutée.

1.1. La camptothécine

1.1.1. Classe de métabolite secondaire

La camptothécine est un alcaloïde quinoléine pentacyclique, il provient du métabolisme du tryptophane (47).

1.1.2. Classe thérapeutique

Anticancéreux : inhibiteur de la topoisomérase I (61), il n'y a pas de classification anatomique, thérapeutique, chimique (ATC) pour la camptothécine car elle n'est pas commercialisée.

1.1.3. Champignon endophyte/plante hôte

Fusarium solani est un exemple de champignon endophyte produisant de la camptothécine. On le retrouve dans *Camptotheca acuminata* et *Nothapodytes nimmoniana* (5). Vingt-huit espèces de champignons endophytes produisant la camptothécine ont été retrouvées chez *Nothapodytes nimmoniana* (62). Le tableau ci-dessous (Tableau 5) cite les principaux endophytes produisant de la camptothécine.

Tableau 5 : Principaux endophytes produisant la camptothécine (63)

Endophytic fungus	Fungal strain	Host plant
Botryosphaeria parva	UAS015	*Nothapodytes nimmoniana*
Entrophospora infrequens	RJMEF 001	*Nothapodytes foetida*
Entrophospora infrequens	5124	*Nothapodytes foetida*
Fusarium sacchari	UAS013	*Nothapodytes nimmoniana*
Fusarium solani	MTCC 9667	*Apodytes dimidiata*
Fusarium solani	MTCC 9668	*Apodytes dimidiata*
Fusarium solani	INFU/Ca/KF/3	*Camptotheca acuminata*
Neurospora sp.	ZP5SE	*Nothapodytes foetida*
Nodulisporium sp.	-	*Nothapodytes foetida*
Unidentified	XK001	*Camptotheca acuminata*

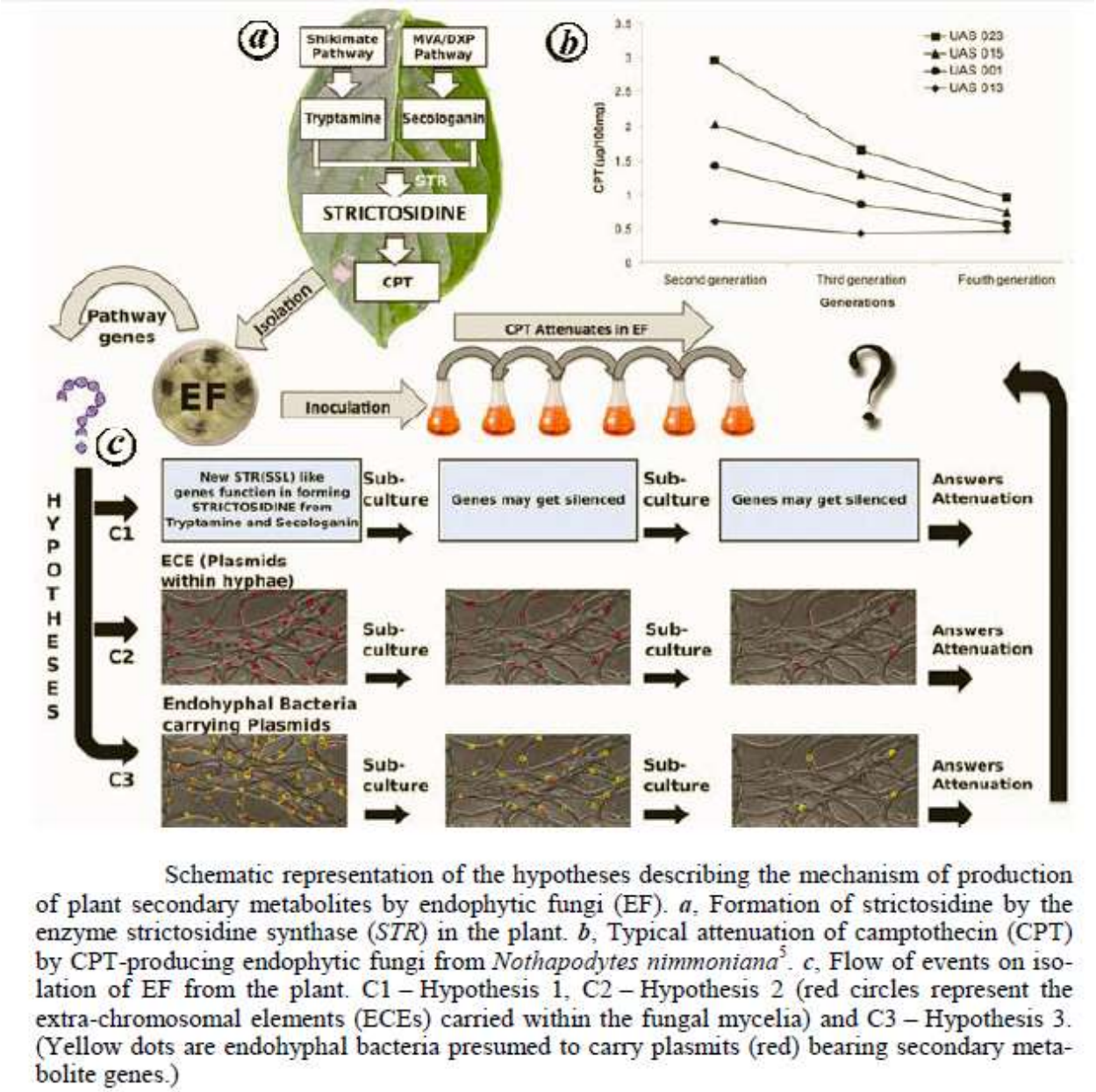
1.1.4. Rôle pour le champignon endophyte ou la plante hôte

La camptothécine et ses dérivés protégeraient la plante et le champignon des insectes et des pathogènes (60). Elle pourrait aussi avoir un rôle de protection contre les chocs thermiques. Une étude montre que le taux de camptothécine augmente, particulièrement dans les bourgeons et les jeunes feuilles de *Camptotheca acuminata* en cas de choc thermique (64).

La plante productrice de la camptothécine doit elle-même se protéger contre cet alcaloïde très toxique. On a observé que la topoisomérase 1 (Topo1) chez la plante est mutée afin que la camptothécine ne puisse se fixer à elle (65). De même les champignons doivent également posséder une topoisomérase mutée pour pouvoir coloniser les plantes productrices de la camptothécine (66).

La camptothécine est produite aussi bien par la plante hôte que par le champignon endophyte (6). Cependant il manquerait au champignon endophyte l'enzyme strictosidine synthase (STR) (présente chez les plantes) nécessaire à la synthèse de la camptothécine, suggérant que le champignon utilise l'enzyme de l'hôte (5). Cela parait inconcevable d'après *Sachin et al*. (67) car le champignon produit cet alcaloïde en culture axénique (Figure 16a) sur plusieurs générations, donc sans la présence de l'hôte. Néanmoins la quantité de camptothécine

produite par le champignon endophyte diminue après plusieurs repiquages (Figure 16b). Ces auteurs suggèrent plusieurs hypothèses afin d'expliquer comment le champignon pourrait produire la camptothécine et pourquoi la quantité de camptothécine diminue après plusieurs repiquage (67) (Figure 16c).



Schematic representation of the hypotheses describing the mechanism of production of plant secondary metabolites by endophytic fungi (EF). *a*, Formation of strictosidine by the enzyme strictosidine synthase (*STR*) in the plant. *b*, Typical attenuation of camptothecin (CPT) by CPT-producing endophytic fungi from *Nothapodytes nimmoniana*[5]. *c*, Flow of events on isolation of EF from the plant. C1 – Hypothesis 1, C2 – Hypothesis 2 (red circles represent the extra-chromosomal elements (ECEs) carried within the fungal mycelia) and C3 – Hypothesis 3. (Yellow dots are endohyphal bacteria presumed to carry plasmits (red) bearing secondary metabolite genes.)

Figure 16 : Hypothèses sur la synthèse de camptothécine par les champignons endophytes (87)

Les trois hypothèses sont :

1) le champignon endophyte possède un gène codant pour la strictosidine synthase like (STR-like), le gène pourrait devenir silencieux ce qui expliquerait pourquoi la quantité de camptothécine diminue au fur et à mesure des repiquages.

2) le gène de la STR se trouve dans des éléments extra-chromosomaux (plasmides) qui proviendraient de la plante hôte. Ces plasmides seraient perdus au cours des repiquages.

3) le gène de la STR est porté par des plasmides de bactéries endophytes du champignon (lui-même endophyte de la plante) qui diminuent au cours des repiquages.

1.1.5. Propriétés pharmacologiques

La camptothécine est un inhibiteur de la topoisomérase I. Cette enzyme permet d'enlever les torsions et surenroulements de l'ADN en clivant un brin de l'ADN (68).

L'ADN est une molécule très longue (on estime à environ 2m la longueur d'un brin d'ADN déroulé chez un mammifère) qui doit tenir dans l'espace très confiné d'un noyau de cellule dont le volume est estimé à $10^{-17}m^3$; par conséquent l'ADN doit former des boucles afin d'occuper un volume plus restreint (68).

Lors de certains processus physiologiques comme la réplication ou la transcription, les doubles brins d'ADN doivent être séparés pour former une fourche de réplication et laisser un espace aux enzymes nécessaires à l'accomplissement de ces processus. L'ouverture des brins d'ADN va créer des super-enroulements et des torsions au niveau de l'ADN (68).

La topoisomérase I va se lier à un seul brin d'ADN. Elle va cliver ce brin en deux et l'enzyme va se lier de manière covalente à l'ADN formant ainsi un complexe de clivage entre l'ADN (clivé) et la Topoisomérase I (appelé TOP1ccs pour Topoisomérase I clivage complexes). Une fois le brin d'ADN coupé, l'autre brin (non coupé) va pouvoir tourner autour du complexe TOP1ccs, l'ADN va ainsi pouvoir se relâcher et éliminer ses torsions. Ensuite la topoisomérase I va religuer le brin clivé *via* son activité ligase puis se détacher de l'ADN (Figure 17) (68) (69).

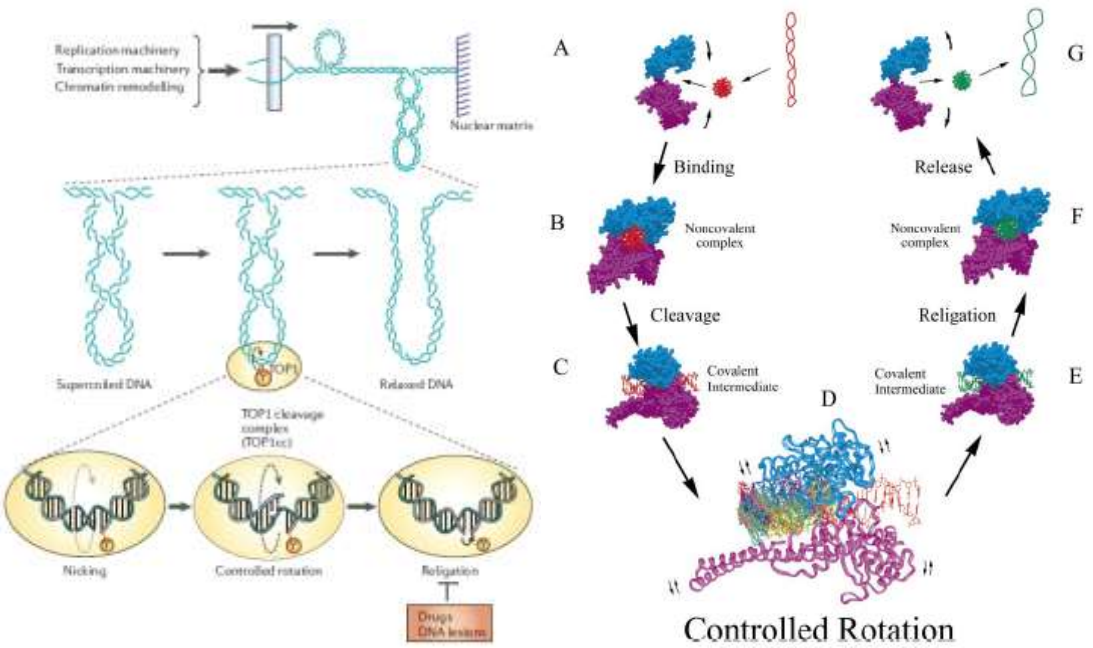


Figure 17 : Fonctionnement de la Topoisomérase 1 (68) (69)

Le TOP1css est normalement une étape transitoire, la camptothécine va piéger ce complexe en le stabilisant. La camptothécine ne se lie pas à la topoisomérase seule, ni à l'ADN mais va se lier simultanément à l'ADN par des interactions hydrophobes et à la topoisomérase par l'intermédiaire de certains acides aminés (asparagine 72, arginine 364, aspartate 533) qui forment des liaisons hydrogènes avec la camptothécine. Des phénomènes de résistance à la camptothécine sont observés lorsque des mutations entrainent une modification de ces acides aminés (perte des liaisons hydrogènes) (68).

Le complexe TOP1css ainsi stabilisé ne va pas relier le brin d'ADN coupé ni se détacher de l'ADN, il va donc être rattrapé par les polymérases nécessaires à la réplication qui se retrouveront bloquées au niveau du complexe TOP1css, formant ainsi des cassures doubles conduisant à la mort de la cellule (arrêt de la division cellulaire) (Figure 18) (68) (70).

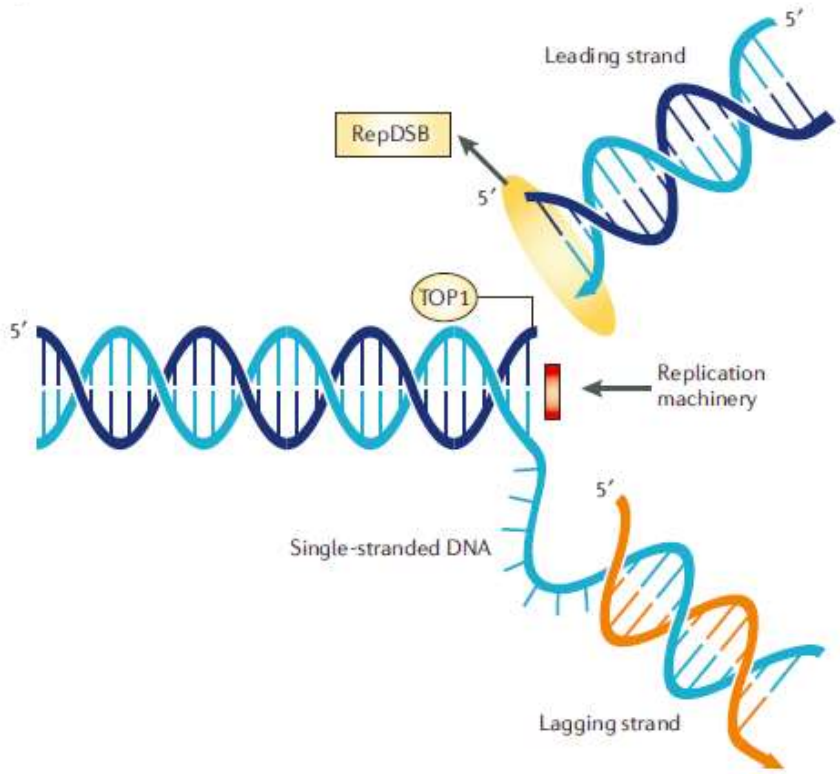


Figure 18 : Blocage de la réplication et formation de cassure double par stabilisation du complexe topo1-ADN clivé (68)
(RepDSB = Replication Double Strand Breaks)

La camptothécine présente en outre des propriétés antivirales intéressantes sur divers virus de la famille des adénovirus, papovavirus et herpesvirus, ces virus possédant un ADN double brin. Elle agirait en inhibant la réplication et la transcription de l'ADN viral (71). Elle serait également active contre les parasites du genre *Leishmania* et aurait une activité antiHIF (Facteur induit par l'hypoxie) (71).

1.1.6. Degré d'exploitation

La camptothécine n'a pas d'autorisation de mise sur le marché (AMM) car elle est trop cytotoxique pour être utilisée comme médicament (71). En revanche, des dérivés de la camptothécine sont commercialisés et utilisés en chimiothérapie (47). La camptothécine sert de matière première dans la synthèse des dérivés utilisés en thérapeutique que sont l'irinotécan (72) (73) et le topotécan (74).

L'irinotécan (CAMPTO®) est indiqué (61) (75) :

- dans le traitement des cancers colorectaux avancés en association avec le 5-fluorouracile et l'acide folinique (protocole FOLFIRI).
- en traitement de première ligne chez les patients atteints de cancer colorectal métastasique en association avec le 5-fluorouracile, l'acide folinique et le bevacizumab ou en association avec la capécitabine (avec ou sans bevacizumab) (protocole XELIRI).

L'irinotécan possède une activé anticholinestérase (inhibition de l'acétylcholinestérase, enzyme responsable de la dégradation de l'acétylcholine). démontrée chez l'animal (76) et peut entrainer un syndrome cholinergique chez l'homme (77).

Ses principaux effets indésirables sont les suivants : diarrhées, nausées, vomissements, alopécie, neutropénie.

Le topotécan (HYCAMTIN®) est indiqué (61) (75) :

- dans le traitement du cancer bronchique à petites cellules en rechute précoce (moins de 3 à 6 mois après la fin de la chimiothérapie initiale),
- dans le traitement du carcinome de l'ovaire après échec d'une ou plusieurs lignes de chimiothérapies.

  Ses principaux effets indésirables sont les suivants : myélosuppression sévère, neutropénie, anémie et alopécie.

En 2003, on estime que le topotécan et l'irinotécan ont rapporté environ 1 milliard de dollars à l'industrie pharmaceutique productrice de ces molécules (78).

1.2. L'ergotamine

1.2.1. Classe de métabolite secondaire

L'ergotamine est un alcaloïde à noyau ergoline, dérivé du tryptophane.

1.2.2. Classe thérapeutique

Classification ATC : N02CA02 (61)

N : médicament du système nerveux

N02 : analgésique

N02C : médicament antimigraineux

N02CA : alcaloïde de l'ergot de seigle

N02CA02 : ergotamine

1.2.3. Champignon endophyte/plante hôte

Des champignons endophytes de la famille des Clavicipitaceae produisent l'ergotamine. Un exemple est *Neotyphodium lolii* colonisant *Lolium perenne* (79).

1.2.4. Rôle pour le champignon endophyte ou la plante

Les alcaloïdes dérivés de l'ergot sont toxiques pour un large spectre d'agresseurs vertébrés (80). Ils sont produits par les champignons issus de la famille des Clavicipitaceae. L'ergotamine a un rôle de défense pour le champignon endophyte producteur et sa plante hôte.

1.2.5. Propriétés pharmacologiques

L'ergotamine est utilisée dans le traitement des crises de migraine. Une migraine est un type de céphalée dû à une hyperexcitabilité neuronale d'origine génétique ou environnementale (81).

La céphalée migraineuse est liée à plusieurs mécanismes (81) notamment *via* l'activation du système trigémino-vasculaire : celle-ci va entraîner une inflammation et une vasodilatation avec notamment la libération de substance P (peptide vasodilatateur), de Neurokinine A, du peptide relié au gène de la calcitonine CGRP (neuropeptide vasodilatateur) (82).

A l'inverse l'activation des récepteurs de la sérotonine va empêcher la libération de certaines substances médiatrices de la douleur et entraîner une vasoconstriction des vaisseaux intracérébraux.

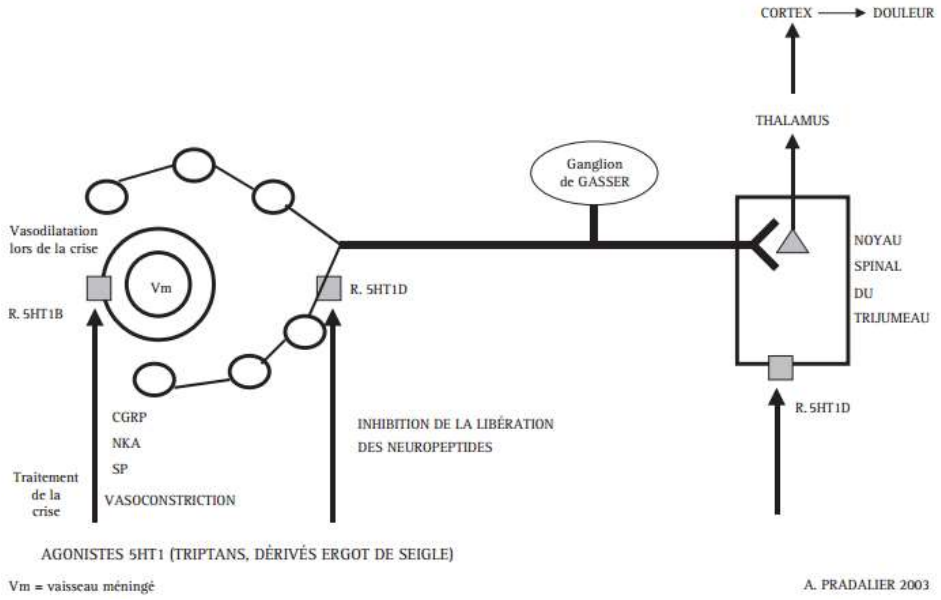


Figure 19 : Site d'action des médicaments antimigraineux (83)

L'ergotamine agit sur différentes familles de récepteurs (Figure 19) : sérotoninergiques, adrénergiques et dopaminergiques (84) (85). Elle va notamment avoir une action tonique sur la musculature lisse vasculaire (75).

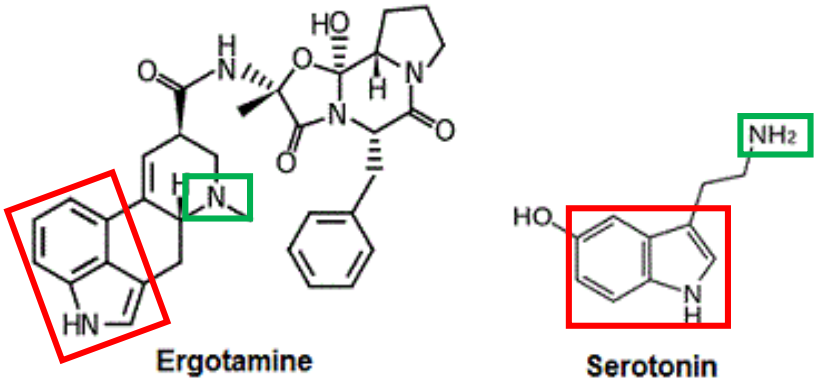


Figure 20 : Structure de l'ergotamine et de la sérotonine

Le mode d'action de l'ergotamine est lié à son homologie structurale avec la sérotonine. Les structures de l'ergotamine et de la sérotonine montrent des similarités (Figure 20) (84) :

- présence d'un noyau indole
- présence d'une fonction amine ionisable à pH physiologique à une distance de deux carbones du noyau indole

Ces deux éléments communs vont permettre à ces deux molécules de se lier aux récepteurs de la sérotonine 5-HT_{1B} (86) :

- par la formation d'une liaison ionique entre l'amine chargée positivement et un acide aminé aspartate chargé négativement du récepteur (87),
- par la formation d'une liaison hydrogène entre l'hydrogène de l'atome d'azote du cycle indolique et l'oxygène d'une thréonine du récepteur,
- le cycle indolique (structure plane) s'insère dans une poche hydrophobe entre les acides aminés à chaîne hydrophobe du récepteur (cystéine, isoleucine, tryptophane, et phénylalanine)

L'activité agoniste de l'ergotamine sur les récepteurs de la sérotonine (récepteur 5-HT pour 5-hydroxytryptamine) 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, et 5-HT_{1F} serait responsable des effets bénéfiques de l'ergotamine dans le traitement des migraines tandis que les effets secondaires seraient dus à son activité agoniste sur les récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} et dopamine D2 (82).

L'ergotamine entre donc en compétition avec la sérotonine en se fixant sur les récepteurs présynaptiques et 5-HT_{1B} 5-HT_{1D}. L'ergotamine favorise ainsi la libération de la sérotonine et

empêche la libération des composés vasodilatateurs (84) (82). Elle inhibe également l'inflammation neurogène (82).

L'action agoniste sur les récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} et dopamine D2 pourrait être à l'origine des effets indésirables de types nausées/vomissements que l'on retrouve fréquemment chez les patients sous ergotamine (82). Les actions agonistes sur les récepteurs adrénergiques et 5-HT_{2A} ont un effet vasoconstricteur en périphérie (82) sur différents vaisseaux sanguins incluant par exemple ceux du système pulmonaire (85) et les artères coronaires (82). Ces effets contre-indiquent l'ergotamine par exemple en cas de syndrome de Raynaud ou d'hypertension artérielle non contrôlée (61).

L'ergotamine est également contre-indiquée avec les inhibiteurs des cytochromes P450 (CYP3A4) comme les macrolides car ils diminuent la métabolisation (détoxification) de l'ergotamine par ces enzymes. Il y a donc un risque de surdosage qui se manifeste par un tableau d'ergotisme. L'ergotamine est également contre-indiquée avec les triptans (autres médicaments de la migraine agissant sur les récepteurs sérotoninergiques) à cause de leur effet synergique pouvant provoquer un vasospasme (84) (61).

L'ergotamine expose également à un risque d'abus (85), celle-ci pouvant paradoxalement augmenter la fréquence des maux tête (effet rebond) (84) (82), conduisant le patient à prendre une dose quasiment quotidiennement entrainant un risque de surdosage.

L'ergotisme se définit comme une vasoconstriction artérielle intense produisant des signes et symptômes d'ischémie des extrémités ou d'autres tissus (comme des vasospasmes rénaux ou cérébraux). En cas de non traitement, une gangrène est possible. La plupart des cas d'ergotismes sont associés à une intoxication chronique et/ou un surdosage et/ou une interaction médicamenteuse (61).

Les symptômes de l'ergotisme sont : douleurs abdominales, nausées, vomissements, céphalées, troubles du rythme (tachycardie ou bradycardie) associés à une hypotension, troubles respiratoires, vertiges, paresthésies, ischémie et douleurs des extrémités (acromélalgie), gangrène, convulsion, coma (61).

L'ergotamine a aussi une action utérotonique (85).

1.2.6. Degré d'exploitation

L'ergotamine en association avec la caféine possède une AMM, elle est commercialisée en France sous le nom de Gynergène®. La caféine augmente l'absorption intestinale de l'ergotamine (82) (61).

Le Gynergène® est utilisé en deuxième intention dans le traitement des crises sévères de migraine. Le traitement de première intention est basé sur les triptans (75). Ce sont des agonistes des récepteurs sérotoninergiques $5HT_{1B/1D}$ (comme les dérivés de l'ergot) mais ils sont plus sélectifs et n'activeraient que $5HT_{1B}$, les $5HT_D$ et $5HT_F$. (88) (84). Les dérivés de l'ergot ont en revanche un coût de production et un prix de vente plus bas que les triptans (88) (61).

Le Diergospray® est un spray nasal à base de dihydroergotamine (un dérivé hémi-synthétique d'ergotamine) toujours commercialisé dans le traitement des crises sévères de migraine (en 2ème intention comme le Gynergène®).

De nombreux médicaments dérivés de l'ergot de seigle ont étés retirés du marché en raison d'une balance bénéfice/risque défavorable. Il s'agit des principes actifs ayant une AMM dans le traitement de fond de la migraine, ainsi que le traitement à visée symptomatique du déficit pathologique cognitif et neurosensoriel chronique du sujet âgé (89).

1.3. La Lovastatine

1.3.1. Classe de métabolite secondaire

La lovastatine est un métabolite secondaire provenant de la voie des polycétides.

1.3.2. Classe thérapeutique

Classification ATC : C10AA02

C : médicament du système cardiovasculaire

C10 : agent modifiant les lipides

C10A : agent modifiant les lipides sériques, non associé

C10AA : inhibiteur de l'HMGCoA réductase

C10AA02 : lovastatine

1.3.3. Champignon endophyte/plante hôte

La lovastatine est produite par *Aspergillus niger* souche *PN2*, un champignon endophyte de *Taxus baccata* (54).

1.3.4. Rôle pour le champignon endophyte ou la plante

Le rôle de la lovastatine chez le champignon n'est pas connu, une étude a démontré que la lovastatine pouvait déclencher une forme d'apoptose en inhibant la prénylation de certaines protéines comme les protéines Ras (90). D'autres études, en montrant une efficacité des statines en thérapeutiques contre des champignons (91) suggèrent que la lovastatine serait un moyen de défense contre les champignons pathogènes.

1.3.5. Propriétés pharmacologiques

La lovastatine diminue la production de cholestérol en inhibant l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (HMG-CoA réductase), une enzyme qui catalyse la réaction qui vise à produire du mévalonate à partir d'hydroxyméthylglutarylCoenzymeA (HMGCoA). Il s'agit d'une étape précoce et limitante de la biosynthèse du cholestérol (61) (92).

Le mévalonate n'est pas qu'un précurseur du cholestérol, c'est un composé central du métabolisme (Figure 21), par conséquent, inhiber sa synthèse va engendrer de nombreux effets au sein des cellules et d'un organisme, on parle d'effet pléiotrope des statines (Figure 22).

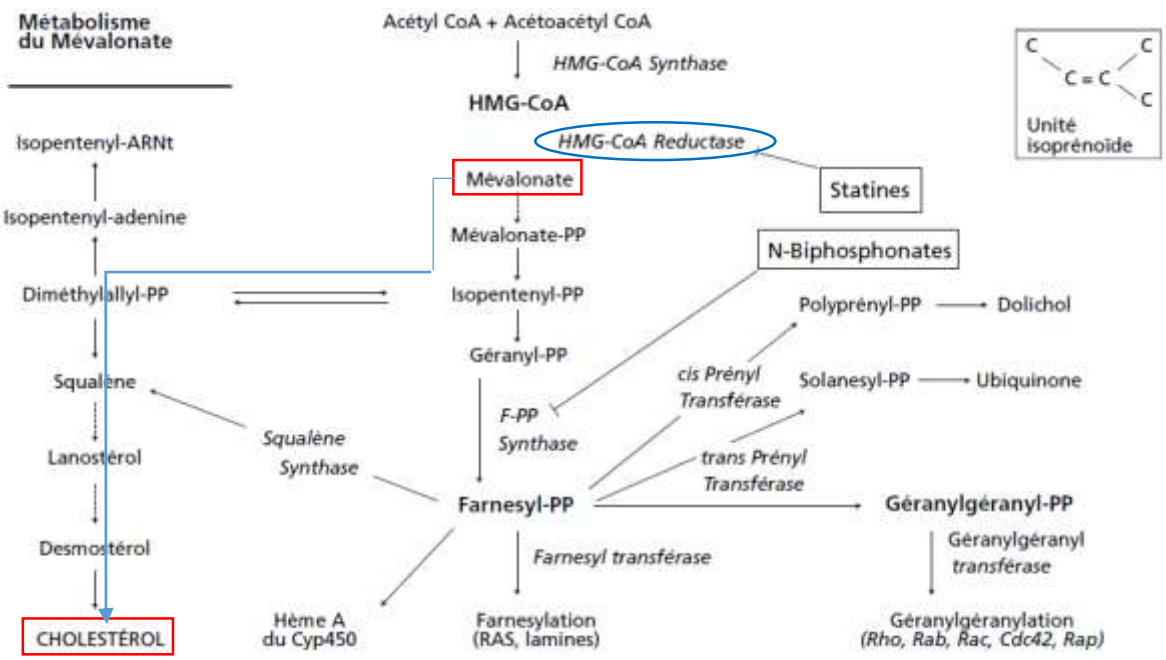


Figure 21 : Métabolisme du mévalonate (93)

- Effet sur les protéines. L'inhibition de la synthèse du mévalonate va entraîner une diminution du taux d'intermédiaires isoprénoïdes comme le farnésylpyrophosphate (FPP) et le géranylgéranylpyrophosphate (GGPP), empêchant l'isoprénylation de certaines protéines (exemple : protéine Ras, Rho l'hème A), les rendant ainsi inactives (92).

- Effet sur la fonction endothéliale (94) : les statines augmentent la production de NO (monoxyde d'azote), puissant vasodilatateur, améliorant ainsi la perfusion myocardique dans les zones hypo-perfusées (93). Elles stimulent aussi la production des NO synthases endothéliales constitutives (eNOS) (95) en stabilisant leur ARNm. Elles empêchent le LDL cholestérol d'inhiber les eNOS (92). Les statines augmentent également le nombre de précurseurs des cellules endothéliales (92) (94).

- Effet sur les plaquettes : le NO inhibe l'agrégation plaquettaire, donc par leurs effets sur le NO, les statines diminuent l'agrégation plaquettaire. Elles diminueraient également la production de thromboxane A2 (92).

- Effet sur la plaque d'athérome (94) : stabilisation de la plaque, notamment en diminuant le taux de lipides, et la synthèse de métalloprotéinases (92) (93).

- Effet sur l'inflammation (94) : les statines réduisent la réponse inflammatoire en diminuant le nombre et l'activité des cellules de l'inflammation et en baissant le taux de la protéine C réactive (92) (93).

- Effet sur la prolifération cellulaire et le cancer : la lovastatine est capable d'inhiber la progression du cycle cellulaire en phase G1 car elle diminue la farnésylation de l'oncoprotéine p21 (96). Elle est également capable de diminuer les propriétés métastasiques du mélanome (97).

- Effet sur l'ostéoporose : la lovastatine active la transcription du facteur de croissance BMP-2 (protéine osseuse morphogène 2) qui stimule la prolifération et la différenciation des ostéoblastes (98). Elle aurait également une activité inhibitrice sur les ostéoclastes (99). Des études montrent que le risque de fracture est moins présent chez les consommateurs de statines (100) (101).

Statin Pleiotropy

Effect	Benefit
Increased synthesis of nitric oxide	Improvement of endothelial dysfunction
Inhibition of free radical release	
Decreased synthesis of endothelin-1	
Inhibition of LDL-C oxidation	
Upregulation of endothelial progenitor cells	
Reduced number and activity of inflammatory cells	Reduced inflammatory response
Reduced levels of C-reactive protein	
Reduced macrophage cholesterol accumulation	Stabilization of atherosclerotic plaques
Reduced production of metalloproteinases	
Inhibition of platelet adhesion/aggregation	Reduced thrombogenic response
Reduced fibrinogen concentration	
Reduced blood viscosity	

Figure 22 : Résumé de l'effet pléiotrope des statines (92)

Les effets indésirables les plus fréquents de la lovastatine sont : diarrhée, constipation, douleurs intestinales, douleurs musculaires, céphalée (102). Les douleurs musculaires sont des effets indésirables particulièrement fréquents qui peuvent aller jusqu'à une rhabdomyolyse potentiellement fatale (103).

1.3.6. Degré d'exploitation

La lovastatine n'est pas commercialisée en France sous forme de médicament, mais on la retrouve sous forme de complément alimentaire dans des produits à base de levure de riz rouge *Monascus purpureus* (la lovastatine est souvent nommée monacoline k dans ces compléments alimentaires). Plusieurs cas de myalgies sont apparus après la consommation de ces compléments alimentaires (104).

Des principes actifs de la même classe chimique que la lovastatine sont commercialisés en France. La pravastatine et la simavastatine ont des structures proches de la lovastatine.

La lovastatine est la première statine à avoir été mise sur le marché. Elle est commercialisée dans plusieurs pays comme le Canada et les Etats-Unis sous le nom de Mevacor® (103).

Indication de la lovastatine aux Etats-Unis :

- prévention primaire des maladies coronariennes (diminution du risque d'angor instable et d'infarctus du myocarde)
- chez les patients présentant des maladies coronariennes, la lovastatine est utilisée pour ralentir la progression de l'athérosclérose.
- hypercholestérolémie

1.4. Le paclitaxel (Taxol®)

1.4.1. Classe de métabolite secondaire

Le paclitaxel (Figure 23) est un métabolite secondaire de la classe des terpénoïdes, il s'agit plus précisément d'un diterpénoïde.

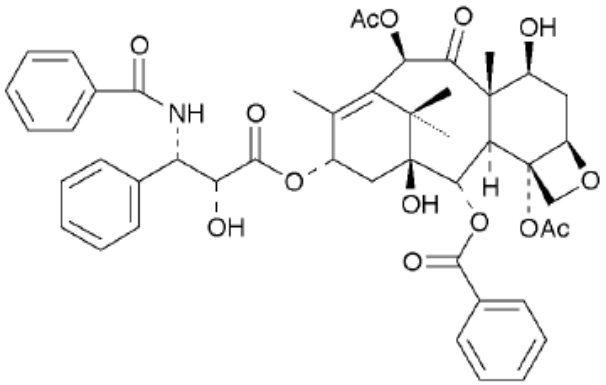


Figure 23 : Structure du paclitaxel

1.4.2. Classe thérapeutique

Classification ATC : L01CD01

L : antinéoplasiques et immunomodulateurs

L01 : antinéoplasiques

L01C : alcaloïdes végétaux et autres produits naturels

L01CD : taxanes

L01CD01

1.4.3. Champignon endophyte/plante hôte

De nombreux champignons endophytes produisent le paclitaxel, ceux-ci appartiennent principalement aux genres *Taxomyces*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium* et *Alternaria* et la plante hôte est très souvent du genre *Taxus* (63) (Tableau 6).

Tableau 6 : Exemple de champignons endophytes produisant le paclitaxel (63)

Champignon endophyte (souche)	**Plante hôte**
Alternaria sp. (Ja-69)	*Taxus cuspidata*
Fusarium mairei (UH23)	*Taxus chinensis*
Pestalotiopsis versicolor (BSL038)	*Taxus cuspidata*
Taxomyces andreanae	*Taxus brevifolia*

1.4.4. Rôle pour le champignon endophyte ou la plante

Le paclitaxel serait une molécule de défense pour la plante, elle empêcherait la croissance de certains champignons pathogènes pour la plante, mais tous les champignons ne sont pas sensibles au paclitaxel, notamment certaines souches des genres *Aspergillus* et *Fusarium* (105), deux genres présentant des espèces de champignons endophytes capables de produire le paclitaxel (63).

1.4.5. Propriétés pharmacologiques

Le paclitaxel est une molécule anticancéreuse et plus particulièrement un poison du fuseau mitotique. Il va stimuler l'assemblage des dimères de tubuline en microtubules et inhiber leur dépolymérisation (106).

Le paclitaxel va ainsi bloquer la réplication des cellules eucaryotes à la fin de la phase G2 du cycle cellulaire (106).

Les microtubules sont formés à partir de l'assemblage de dimères de tubuline. Les tubulines sont des protéines de structure, il en existe plusieurs types. Les tubulines alpha et béta peuvent se dimériser pour former un dimère de tubuline (107). Les microtubules sont dans un état d'équilibre dynamique avec les dimères de tubulines. La présence de GTP (Guanosine triphosphate) et une température proche de 37°C favorisent la formation de la forme microtubule (polymérisée) au profit de la forme dimère de tubuline (dépolymérisée). A l'inverse la présence de calcium et une température faible va favoriser la dépolymérisation des microtubules.

Le paclitaxel va rompre cet équilibre en le déplaçant vers la forme microtubule (polymérisée) au profit de la forme dimère de tubuline (dépolymérisée) (Figure 24). Il en résulte une baisse critique de la concentration en tubulines or ceux-ci sont nécessaires à la formation des microtubules (106).

Le paclitaxel est capable de polymériser des dimères de tubuline en microtubules en l'absence de GTP et de protéines associées aux microtubules normalement requises pour cet assemblage (106).

Les microtubules sont stables en présence de paclitaxel, même lors de l'ajout de $CaCl_2$ ou en cas de diminution de la température, deux paramètres qui d'ordinaire déstabilisent le polymère (108).

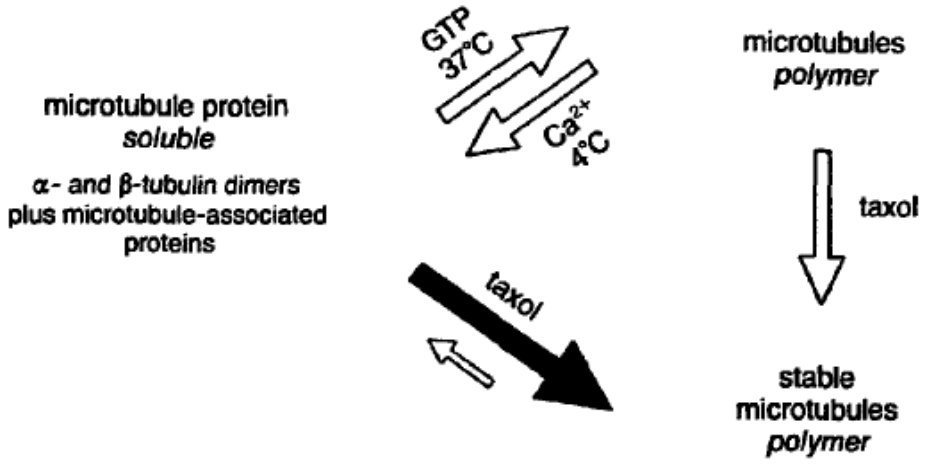


Figure 24 : Le paclitaxel stabilise la formation des microtubules au profit de la forme tubuline (106)

Les microtubules sont des composés jouant un rôle très important dans le fonctionnement d'une cellule. Ils sont un composant essentiel du fuseau mitotique (indispensable à la division cellulaire) et servent à maintenir la forme de la cellule et le transport des organites dans une cellule. Une modification de leur état d'équilibre dynamique va perturber la division cellulaire et l'activité de la cellule (106).

Le paclitaxel se lie spécifiquement et de manière réversible aux microtubules (préférentiellement à la sous unité de tubuline béta, uniquement lorsque celle-ci est incorporée dans un microtubule) (107).

Le paclitaxel va induire un blocage de la mitose en activant le « *spindle assembly checkpoint* », un mécanisme de contrôle majeur de la mitose qui sert à prévenir la mauvaise séparation des chromosomes (108). Le blocage de la mitose peut entraîner plusieurs réponses (107) (Figure 25) :

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

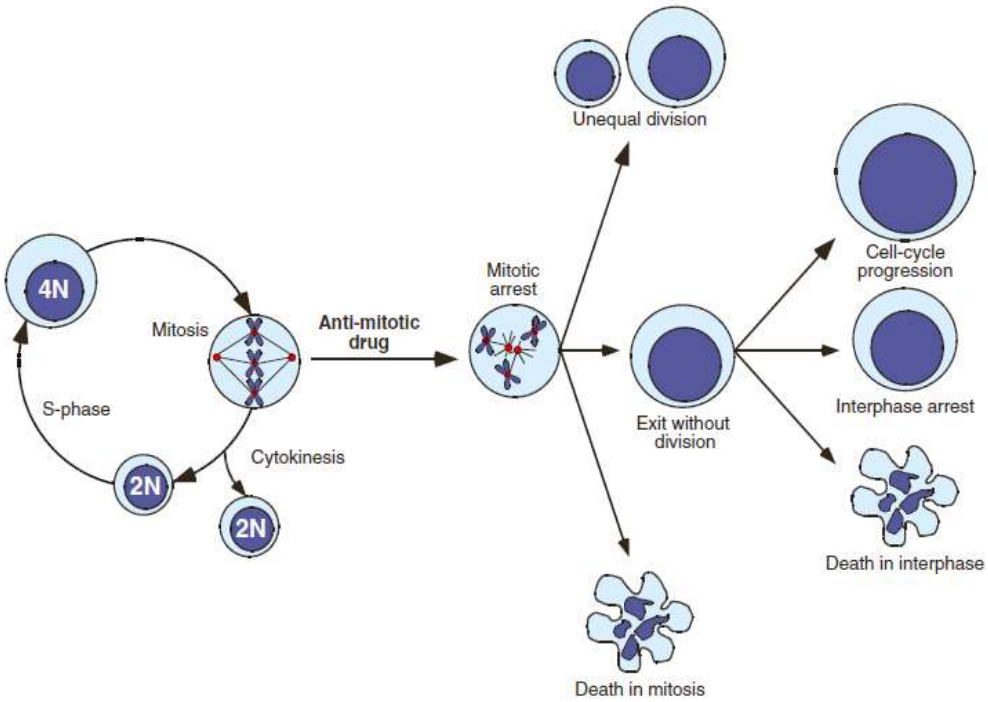


Figure 25 : Devenir d'une cellule en présence d'une molécule antimitotique comme le paclitaxel (107)

1.4.6. Degré d'exploitation

Le paclitaxel a été isolé et purifié en 1971, mais ce n'est qu'à partir des années 90 qu'il a été approuvé par la FDA (food and drug administration) et obtenu son AMM (109). Le paclitaxel (Taxol®) est un médicament très utilisé en cancérologie. Il possède les indications suivantes (61) :

Dans le cancer de l'ovaire :

- en première intention chez les patientes présentant une maladie avancée ou résiduelle, en association avec le cis-platine
- en deuxième intention chez les patientes présentant un carcinome métastasique après échec du traitement classique à base de sel de platine

Dans le cancer du sein :

- carcinome du sein avec envahissement ganglionnaire, en traitement adjuvant
- traitement des carcinomes métastasiques du sein pour les patientes en échec ou non candidates au traitement classique à base d'anthracycline

Dans le cancer bronchique non à petites cellules en association avec le cis-platine chez les patients qui ne sont pas candidats à une chirurgie et/ou une radiothérapie (61).

De nombreux effets indésirables sont possibles sous paclitaxel, notamment une myélosuppression (souvent une neutropénie), des réactions d'hypersensibilité, une alopécie (réversible) et une neuropathie périphérique (75).

Le Taxol® aurait rapporté 1,5 milliard de dollars en 1999 à Bristol-Myers Squibb et rapporterait toujours autour de 1 milliard de dollars par an (la baisse serait avant tout liée à l'arrivée de génériques en Europe) (110).

2. Utilisation des champignons endophytes comme producteurs de molécules d'intérêt

2.1. Contexte

Les champignons sont capables de synthétiser des molécules d'intérêt thérapeutique. Un certain nombre d'entre elles se trouvent être des molécules nouvelles (111), d'autres ont déjà été décrites auparavant chez les plantes. Certaines de ces molécules ont une forte valeur ajoutée, leur production à grande échelle est liée à de forts enjeux économiques.

Différents modes de synthèse sont possibles pour produire ces molécules :

- extraction des plantes
- synthèse chimique complète
- hémi-synthèse
- culture cellulaires de plantes
- culture du champignon endophyte

L'extraction des plantes ne donne pas toujours de bon rendement (les métabolites secondaires représentent souvent moins de 1% de la masse sèche de la plante). De plus, le rendement dépend de l'environnement et des conditions climatiques (112). Les demandes importantes en principes actifs (Tableau 7) peuvent avoir des conséquences écologiques désastreuses. Les plantes utilisées pour extraire la camptothécine sont par exemple menacées d'extinction (5).

La synthèse chimique est souvent compliquée et coûteuse pour les métabolites complexes. Il faut environ 20 étapes et une utilisation de solvant « dur » pour synthétiser entièrement le paclitaxel (113).

L'hémi-synthèse nécessite l'extraction de composés d'origine végétale au rendement de production variable.

La culture cellulaire de plante est difficile, les rendements sont souvent faibles, et le « *scale-up* » est difficile (60).

Tableau 7 : Marché mondial des molécules d'intérêt produites par les endophytes (60)

Compound	Uses	Demand and supply statistics	Reference
Taxol	Antitumor	• Annual sales in 2006 = 3.7 billion USD • Annual demand = 600 kg • Treatment per patient consumes about eight 60-year-old yew trees • 10,000 kg of *Taxus* bark or 3000 yew trees = 1 kg of taxol	Malik et al. (2011)
Camptothecin	Antitumor	• Supplied from two plants – *Camptotheca acuminata* and *Nothapodytes foetida* – both critically endangered • ~1000–1500 tons of wood chips = 1 ton of camptothecin • Annual sales in 2003 = 1 billion USD • Annual biomass demand in India in 2006 = 500–700 metric tons • Annual biomass demand in Japan in 2006 = 1000 metric tons • Global camptothecin demand in 2011 required 100 million trees	Patwardhan (2006)
Vinca alkaloids	Antitumor	• Very low yield from plant (0.0003% DW) • Annual demand = 0.3 tons • Annual sales = 200 million USD • Production via plant cell cultures unsuccessful so far	Hendrawati et al. (2012)
Digitalis glycosides	Cardiotonic	• Annual demand = 1000 metric tons plant material • Patients require 1 mg/day • Worldwide drug demand = several thousand kilograms per year • India – annual demand ≥30 quintals	Mangathayaru (2013)
Diosgenin	Progesterone precursor	• Accounts for 2/3rds of the total world consumption of steroids • Annual demand = 3000 tons • India – annual demand = 150 tons. • India total production = 30 tons	Dangi et al. (2014)
Podophyllotoxin	Antitumor	• Only 2 plant sources known – *Podophyllum hexandrum* and *Podophyllum peltatum* – both endangered • Annual demand ≥100 metric tons • Annual supply = 50–80 tons	Alam et al. (2009)

2.2. Principe

Pour pouvoir produire une molécule d'intérêt, il faut tout d'abord isoler le champignon endophyte de la plante. On effectue en premier lieu un rinçage des organes végétaux à l'eau distillée, puis on stérilise le fragment de la plante avec de l'éthanol à 70% et de l'hypochlorite de sodium. Après rinçage à l'eau distillée stérile, les échantillons sont coupés en échantillons de quelques millimètres, puis placés dans un milieu de culture gélosé. L'incubation se fait à une température comprise entre une vingtaine de degrés (température ambiante) et 37°C (114) (115) (116).

Dès que les champignons commencent à se développer, on les repique séparément sur des milieux de culture adaptés. Il s'agit du milieu *« potatoes dextrose agar »* (PDA) composé de glucose, pomme de terre et agar, le milieu de Sabouraud (composé de glucose, peptone et agar) mais surtout le milieu Malt « malt extract agar » (composé d'extrait de malt, de peptone et d'agar) (117), les milieux sont généralement supplémentés en antibiotiques.

On déclenche ensuite la sporulation du champignon en le plaçant dans un milieu favorisant la production des spores (à base de mélasse et de sels) (118) et les spores sont récupérées, pour ensuite inoculer des bioréacteurs pour produire les molécules d'intérêt.

2.3. Limites

Bien que beaucoup d'études montrent que les champignons endophytes sont capables de produire de nombreux métabolites d'intérêt, aucun d'entre eux n'a pour l'instant été exploité en production industrielle (119), car deux problèmes se posent :

1) Le rendement de production est trop faible. Pour le paclitaxel, il n'excède pas 1mg/L (Tableau 8) (63) (62).
2) Le rendement est très variable d'une souche à l'autre, *Aspergillus niger* var.*taxi* produit plus de 1000 fois plus de paclitaxel qu'*Alternaria* sp. (pour une même plante hôte)

Tableau 8 : Rendement de production du paclitaxel par des souches fongiques (63)

Endophytic fungus	Fungal strain	Host plant	Paclitaxel yield (µg/L)
Alternaria sp.	Ja-69	*Taxus cuspidata*	0.16
Alternaria sp.	-	*Ginkgo biloba*	0.12-0.26
Alternaria alternate	TPF6	*Taxus chinensis* var. *mairei*	84.5
Aspergillus fumigatus	EPTP-1	*Podocarpus* sp.	557.8
Aspergillus niger var. *taxi*	HD86-9	*Taxus cuspidata*	273.6
Botryodiplodia theobromae	BT115	*Taxus baccata*	280.5
Botrytis sp.	XT2	*Taxus chinensis* var. *mairei*	161.24
Botrytis sp.	HD181-23	*Taxus cuspidata*	206.34
Cladosporium cladosporioides	MD2	*Taxus media*	800
Ectostroma sp.	XT5	*Taxus chinensis* var. *mairei*	276.75
Fusarium arthrosporioides	F-40	*Taxus cuspidata*	131
Fusarium lateritium	Tbp-9	*Taxus baccata*	0.13
Fusarium mairei	Y1117	*Taxus chinensis* var. *mairei*	2.7
Fusarium mairei	UH23	*Taxus chinensis* var. *mairei*	286.4
Fusarium solani	-	*Taxus celebica*	1.6
Fusarium solani	Tax-3	*Taxus chinensis*	163.35
Metarhizium anisopliae	H-27	*Taxus chinensis*	846.1
Monochaetia sp.	Tbp-2	*Taxus baccata*	0.10
Mucor rouxianus	DA10	*Taxus chinensis*	-
Nigrospora sp.	SGLAf14	*Taxus globosa*	0.142-0.221
Ozonium sp.	BT2	*Taxus chinensis* var. *mairei*	4-18
Papulaspora sp.	XT17	*Taxus chinensis* var. *mairei*	10.25

3) La diminution du rendement de production après plusieurs repiquages en milieu de culture (Tableau 9). Ce mécanisme n'est pas encore élucidé mais il peut s'expliquer par le fait que le champignon ait besoin de la plante hôte pour activer des voies métaboliques particulières ou bien par le fait que certains gènes de biosynthèse

soient extra-chromosomiques et s'épuisent au fur et à mesure des générations, ou encore que d'autres gènes deviennent silencieux (62) (67).

Tableau 9 : Diminution de la production des métabolites secondaires par les champignons endophytes après plusieurs repiquages (62)

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

2.4. Améliorations/perspectives

Deux types de stratégies sont décrites dans la littérature pour améliorer le rendement de production des champignons endophytes : celle qui vise à améliorer les conditions de culture et celle qui vise à améliorer directement la souche fongique (60) (Figure 26).

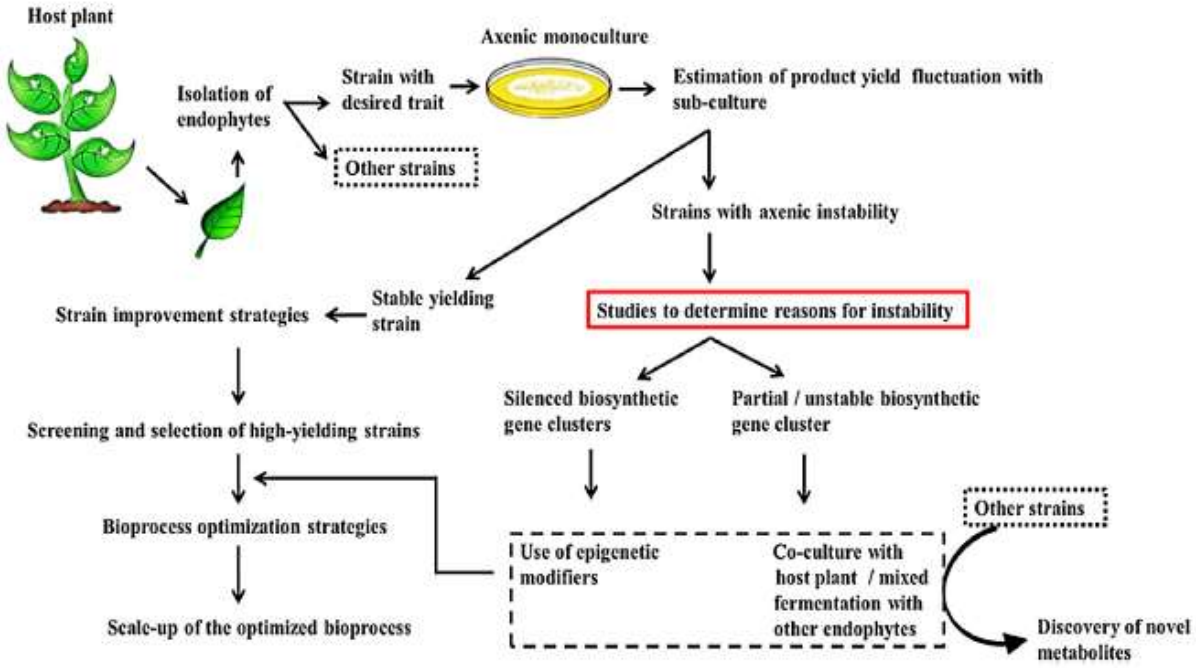


Figure 26 : Approche rationnelle permettant d'optimiser la production de métabolites secondaires par les champignons endophytes (60)

2.4.1. Mutagenèse

Il est possible d'augmenter le rendement de production d'une souche, par mutagenèse aléatoire à l'aide d'agents chimiques ou physiques. Les agents physiques peuvent être des rayons X, gamma, ultraviolets, des micro-ondes ; les agents chimiques couramment utilisés sont l'EMS (Méthanesulfonate d'éthyle), le DES (Diéthylsulfate) et le NTG (N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) (120) (60). Généralement on utilise une combinaison d'agents physiques et chimiques. L'impact de la mutagénèse sur le rendement de production des souches fongiques est résumé ci-dessous (Tableau 10).

Tableau 10 : Impact de la mutagénèse sur le rendement de production (60)

Product	Wild-type strain	Mutant strain	Mutagen	Yield enhancement	Reference
Taxol	HD1-3	UN25-3	UV, NTG and UV + NTG	1.4 fold	Kai et al. (2008)
Taxol	HD1-3	UD (14–1)	UV + DES	1.34 fold	Zhao et al. (2011e)
Taxol	*Nodulisporium sylviforme* HQD33	*N. sylviforme* NCEU-1	UV, EMS, 60Co (60Co-γ-ray) and NTG	2.5 fold	Zhou et al. (2001)
Taxol	*Fusarium maire* strain Y1 117	*F. maire* K178	UV + DES	8.6 fold	Xu et al. (2006a)
Berberine	S6	S-NU-302	UV, X-rays and $NaNO_2$	170%	Gao et al. (2008)
Tanshinone IIA	*Emericella foeniculicola* TR21	*E. foeniculicola* NU152	UV + NaNO2	1.46 fold	Ma et al. (2011)
Vincamine	XM-J2	XM-UL-7-5	UV-laser	2.1 fold (62.3% increase in biomass)	Yin and Sun (2011)

2.4.2. Ingénierie génétique

Il est possible d'améliorer le rendement de production d'un champignon endophyte en intégrant dans son génome un gène spécifique. Une équipe a réussi à multiplier par 4 le rendement de production du paclitaxel par *Ozonium* sp. (endophyte isolé de *T. chinensis*) en incorporant dans son génome le gène TS (Taxadiene Synthase) codant pour une enzyme nécessaire à la synthèse du paclitaxel (121).

2.4.3. Optimisation des paramètres de fermentation

Il est possible d'améliorer les rendements de production en agissant sur différents paramètres culturaux comme le PH, la température, l'agitation, le temps de fermentation, le milieu de culture, les sources de carbone et d'azote (122). Le tableau ci-dessous (Tableau 11)

traduit l'importance de l'optimisation des paramètres de fermentation sur le rendement de production.

Tableau 11 : Impact des paramètres de fermentation sur le rendement de production (60)

Product	Strain	Optimized parameters	Methodology	Yield enhancement	Reference
Taxol	*Fusarium mairei* UH23	Initial pH, inoculation volume, working volume, temperature, carbon and nitrogen source, fermentation period	Single factor	10.2%	Dai and Tao (2008)
Taxol	Mutant *F. mairei* K178	Nitrogen source and trace elements	Plackett Burman design and RSM	1.3 fold	Xu et al. (2006a)
Taxol	*Nodulisporium sylviforme* UV_{40-19}	pH, temperature, agitation rate, fermentation period	Single factor	1.15 fold (including elicitors)	Zhao et al. (2011d)
Taxol	*Pestalotiopsis microspora* Ne32	Monobasic sodium phosphate	Single factor	2.2 fold (at 1 μg/mL)	Li et al. (1998b)
Palmarumycin C13	*Berkleasmium* sp. Dzf12	Metal ions	RSM	6 fold	Mou et al. (2013)
Palmarumycin C13	*Berkleasmium* sp. Dzf12	Carbon and nitrogen sources	Plackett Burman design and RSM	2.5 fold	Zhao et al. (2013a)
Exo polysaccharide (EPS)	*Berkleasmium* sp. Dzf12	Carbon and nitrogen sources, trace elements	Fractional factorial design and RSM	6.29 fold	Li et al. (2012a)
Zofimarin	*Xylaria* sp. Acra L38	Carbon and nitrogen sources	Orthogonal array design, Plackett Burman design and RSM	8 fold	Chaichanan et al. (2014)
Beauvericin	*Fusarium redolens* Dzf2	Carbon and nitrogen sources, initial pH	Plackett Burman design and RSM	1.27 fold	Xu et al. (2010)
Huperzine	*Colletotrichum gloeosporioides* ES026	Temperature, pH, agitation rate, fermentation period Carbon source	Single factor	28.58% 51.89%	Zhao et al. (2013c)
Berberine	Mutant strain S-NU-3-2	Carbon and nitrogen sources, illumination condition, temperature	L16 (43) orthogonal design	47.2%	Hong and Yang (2010)
Mycoepoxydiene	*Phomopsis* sp. Hant25	Complex media – Czapek yeast autolysate broth (CzYB), Malt Czapek broth (MCzB) and modified M1D medium (MM1D); shaking/static period	Single factor	10.3 fold	Thammajaruk et al. (2011)
Camptothecin	*Fusarium oxysporum* NFX06	Glucose, peptone and $MgSO_4$	RSM	1.02 fold	Musavi et al. (2014)
Camptothecin	*Trichoderma atroviride* LY357	Medium composition, fermentation time, pH, temperature, agitation rate	Single factor	50 to 75 fold (including elicitor and adsorbent addition)	Pu et al. (2013)
Camptothecin	*Entrophospora infrequens* RJMEF001	Medium composition	Single factor	503 ± 25 μg/100 g dry cell mass (in Sabouraud broth)	Amna et al. (2012)
Vincamine	XM-J2	Medium composition and pH	L16 (43) orthogonal design	1.4 fold (1.5 fold increase in biomass)	Yin and Sun (2011)
Sipeimine	*Fritillaria ussuriensis* Fu7	Medium composition and temperature	L16 (44) orthogonal design	77% increase (155% increase in biomass)	Yin and Chen (2011)

2.4.4. Utilisation des éliciteurs

Les éliciteurs sont des molécules de signalisation activant certaines voies métaboliques et déclenchant la production de certains métabolites secondaires. Leur utilisation dans le cadre de la production de paclitaxel et de camptothécine a déjà porté ses fruits (Tableau 12) (60).

Tableau 12 : impact des éliciteurs sur le rendement de production (60)

Product	Organism	Elicitor	Yield enhancement	Reference
Taxol	*Nodulisporium sylviforme* UV_{40-19}	Serine, SA, silver nitrate, ammonium acetate	1.15 fold (including culture parameters)	Zhao et al. (2011d)
Taxol	*Periconia* sp.	Serinol, *p*-hydroxy benzoic acid, β-resorcyclic acid, gallic acid, Benzoic acid	8 fold (0.01 mM benzoic acid) – all other elicitors had positive effect	Li et al. (1998a)
Camptothecin	*Trichoderma atroviride* LY357	Salicylic acid	3.4 fold	Pu et al. (2013)
		Methyl jasmonate	2.2 fold	
		Ca^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}	Slight increase	
		Li^{+}	Slight decrease	
10-Hydroxy camptothecin	*Xylaria* sp.	Ce^{3+}, Cr^{3+}, La^{3+}, MJ, SA, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Se^{5+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Li^{+}	2.7 fold (0.1 mM SA) – except MJ all elicitors had positive effect	Liu et al. (2010)
Palmarumycin C13	*Berkleasmium* sp. Dzf12	Yeast extract	3.2 fold	Zhao et al. (2011c)
Palmarumycin C13	*Berkleasmium* sp. Dzf12	Water extracted polysaccharide from host plant (*Dioscorea zingiberensis*) rhizomes	2.69 fold	Li et al. (2012b)
Palmarumycin C12	*Berkleasmium* sp. Dzf12	Crude oligosaccharide prepared by acid hydrolysis of the water extracted polysaccharide	9.83 fold	Li et al. (2012c)
Palmarumycin C13			3.24 fold	
Huperzine	*Colletotrichum gloeosporioides* ES026	Ethanol and methanol	51.89% (with ethanol)	Zhao et al. (2013c)

2.4.5. Utilisation des précurseurs

L'utilisation des précurseurs est une stratégie qui consiste à apporter, de manière exogène, un intermédiaire d'une voie de biosynthèse. Leur apport doit être parfaitement ajusté, une quantité assez importante est nécessaire pour un effet positif sur la synthèse du métabolite, mais une quantité trop élevée risque d'inhiber la voie de synthèse ou de tuer la cellule (60).

2.4.6. Co-culture

Des stratégies de co-culture entre des cellules de la plante hôte et des cellules du champignon endophyte ont été mises en place afin d'améliorer le rendement de production. Plusieurs études ont montré des résultats prometteurs. Une étude de *Li et al*. (123) a permis d'augmenter 38 fois le rendement de production du paclitaxel (0,68mg/L en 15 jours de culture du champignon seul, contre 25,63mg/L en co-culture).

En pratique les cellules sont ajoutées dans un co-bioréacteur composé de deux compartiments dont certains paramètres comme l'agitation ou le flux d'air peuvent être modulés indépendamment. Les deux compartiments sont séparés par une membrane (filtre pyroxiline de 0,25µm) qui laisse passer les composés chimiques (mais les cellules ne peuvent pas passer au travers). Les résultats sont résumés ci-dessous (Tableau 13).

Tableau 13 : Impact de la co-culture sur le rendement de production (60)

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

L'ensemble de ces stratégies devraient permettre d'améliorer la production des molécules d'intérêt thérapeutique produites par les champignons endophytes. Ces méthodes ont déjà été effectives chez d'autres champignons comme par exemple *Penicillium chrysogenum* et ont permis d'améliorer de façon spectaculaire la production de la pénicilline (124) (125).

QUATRIEME PARTIE : L'ENDOPHYTISME DES CHAMPIGNONS ET LES ECOSYSTEMES

1. Régulation du mutualisme

Les mécanismes permettant l'interaction mutualiste entre champignons endophytes et plantes hôtes sont encore mal connus. Nous avons choisi de présenter un mécanisme de régulation enzymatique qui n'est pas encore totalement élucidé et un mécanisme de plasticité génétique.

1.1. Régulation enzymatique : les NADPH oxydases et la « proteine stress activated » kinase A

Certaines protéines sont suspectées d'avoir un rôle important dans le maintien d'une association mutualiste avec l'hôte. Il est possible de citer le complexe enzymatique NADPH oxydase (NOX) et la protéine stress activated kinase A (SAKA) (35) (126) (Figure 27).

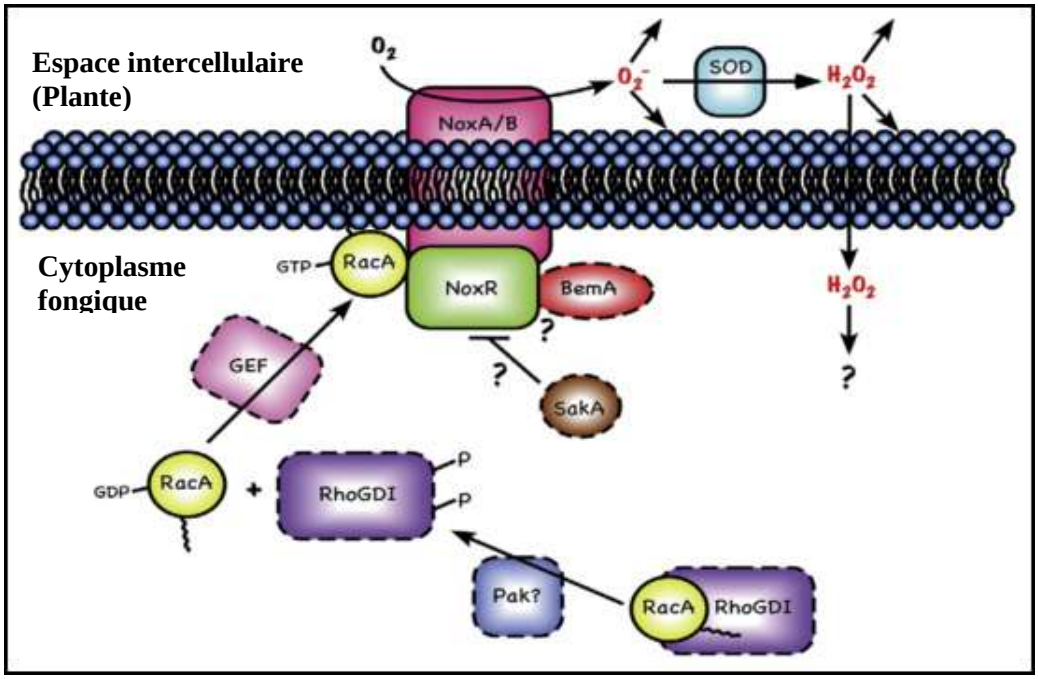


Figure 27 : Rôle du complexe NOXA/B et de la protéine SAKA dans le maintien de l'association mutualiste (126)
Le rôle des autres protéines indiquées sur ce schéma n'est pas encore élucidé.

NOXA : cette protéine, productrice d'ion super oxyde, a un rôle prépondérant dans la croissance et la différenciation cellulaire. Les radicaux libres qu'elle forme en seraient responsables par leur action sur la voie des mitogen activated kinases (MAP kinases) : phosphorylation post-traductionnelle des résidus tyrosines protéiques, ainsi que sur les concentrations en calcium (Ca^{2+}) intracellulaire impliqué dans la croissance apicale polarisée du mycélium. Il a été observé que la suppression de son activité induit l'augmentation incontrôlée de la biomasse du champignon dans l'hôte. Ce développement incontrôlé du champignon provoque le passage d'un mutualisme à un parasitisme : le champignon prolifère anarchiquement, augmentant ses prélèvements en nutriments à l'hôte. L'hôte perd sa dominance apicale du fait du ralentissement de sa croissance, il devient précocement sénescent (127).

NOXB : l'inactivation du gène codant pour cette protéine n'a pas d'effet perturbant sur le mutualisme entre la plante et le champignon (127).

NOXR et RACA : elles sont décrites comme indispensables pour l'activation de NOXA (127).

L'enzyme NOXA joue donc un rôle prépondérant dans le contrôle de la phytopathogénicité du champignon (35).

SAKA : cette protéine, une MAP kinase, a également un rôle prépondérant dans le maintien de l'association mutualiste. La suppression de son activité induit également la prolifération anarchique du champignon, augmentant ses prélèvements en nutriments à l'hôte. L'hôte perd sa dominance apicale du fait du ralentissement de sa croissance, il devient précocement sénescent. Des perturbations dans l'expression de gènes de l'hôte codant pour des phytohormones (auxines, cytokinines et strigolactone) importantes dans la croissance tissulaire de la plante ont également été observées (35). SAKA régulerait également de manière post-traductionnelle l'activité de NOXA (126).

1.2. Plasticité génétique : l'exemple de la résistance aux dérivés de la camptothécine

Il est probable que les deux protagonistes du mutualisme (endophytes et hôtes), développent des mécanismes leur permettant de mieux se tolérer l'un l'autre. Un exemple illustrant cela est l'acquisition, par un champignon endophyte, d'une résistance aux métabolites secondaires d'un hôte. Les métabolites dérivés de la camptothécine possèdent une grande toxicité par leur action inhibitrice de la topo-isomérase 1. Certaines souches de champignons colonisant asymptomatiquement la plante *Camptotheca acuminata* (Figure 28), naturellement productrice de ces dérivés comme mode de défense contre les agresseurs, présentent une topo-isomérase possédant une chaîne d'acides-aminés modifiée lui conférant une résistance aux dérivés de la camptothécine (50).

Figure 28 : La plante *Camptotheca acuminata*, naturellement productrice de camptothécine

2. Impact environnemental des endophytes

Nous décrirons successivement l'impact des endophytes de classe 1 sur les écosystèmes, en nous limitant aux genres *Epichloë* et *Neotyphodium*, pour lesquel les études scientifiques sont plus nombreuses. Puis nous aborderons l'impact des endophytes de classes 2, 3 et 4.

2.1. Impact des endophytes de classe 1

L'impact environnemental des endophytes de classe 1 a été assez largement étudié. Pour mieux l'aborder, nous le décrirons dans trois catégories :

- impact phénotypique sur l'hôte : le champignon endophyte est responsable, dans certaines conditions, d'une modification d'un caractère observable chez la plante hôte.
- impact sur les plantes environnantes : le champignon endophyte est responsable, dans certaines conditions, d'une interaction avec une ou plusieurs plantes voisines de la plante hôte, le plus souvent par l'intermédiaire d'un agent chimique.
- impact sur les animaux et les microorganismes environnants : le champignon endophyte présente une incidence sur une population d'animaux ou de microorganismes présents dans l'environnement ou colonisant/infectant également l'hôte.

L'impact sur l'écosystème de l'endophytisme de classe 1 se fait le plus souvent par l'intermédiaire de nombreux métabolites secondaires bioactifs, produits par les champignons des genres *Epichloë* et *Neotyphodium*. Il est à noter que la production d'un métabolite secondaire est variable selon la nature de l'hôte, l'espèce du champignon et les conditions environnementales. Les espèces ayant un mode de reproduction asexuée, à transmission verticale prépondérante (*Neotyphodium* spp.) ont été décrites comme possédant une plus grande capacité de production de ces métabolites secondaires bioactifs ce qui explique que leur impact environnemental est particulièrement important et étudié (128). Ces métabolites sont répartis en 5 grandes classes décrites ci-après.

- **Les dérivés clavines et les dérivés de l'ergot**

Les dérivés clavines et de l'ergot sont des alcaloïdes dérivés du tryptophane. Le tableau 14 résume leurs bioactivités. Leurs voies de biosynthèse sont indiquées en annexe.

Tableau 14 : Les dérivés de l'ergoline (dérivés clavines, dérivés de l'ergot) et leurs bioactivités

Classe Chimique	Molécule	Endophyte (plante hôte)	Bioactivité
Clavines			Légère toxicité et répulsivité pour les insectes, légère toxicité pour les vertébrés (129) (79).
Clavines	Chanoclavine	*N. coenophialum (F. arundinacea)*	Faibles agonistes dopaminergiques (129) (79).
	Agroclavine	*N. coenophialum (F. arundinacea)*	
	Elymoclavine	*N. coenophialum (F. arundinacea)*	
	Festuclavines	Famille des Trichocomaceae	
	Penniclavine	*N. coenophialum (F. arundinacea)*	
Dérivés de l'ergot			Toxicité importante pour les vertébrés (79).
Ergo-peptines	Ergovaline	*N. lolii – N. coenophialum (F. arundinacea – L. perenne)*	Propriétés vasoconstrictrices et hypoprolactinémiantes. Avec l'ergine, dérivé majeur produit par *N. coenophialum* dans la grande fétuque responsable de la toxicose « foot fescue » observée dans l'élevage (129) (79) (130).
	Ergotamine	*N. lolii – N. coenophialum (F. arundinacea – L. perenne)*	Agoniste partiel récepteur D2 (79).
	Ergocryptine	*C. purpurea – N. coenophialum (F. arundinacea)*	Agoniste partiel récepteur D2 (129) (Structure de base pour l'hémi-synthèse de la bromocriptine par bromination).
	Ergocristine	*C. purpurea – N. coenophialum (F. arundinacea)*	
	Ergocornine	*C. purpurea – N. coenophialum (F. arundinacea)*	
	Ergosine	*C. purpurea – N. coenophialum (F. arundinacea)*	
Ergoamides	Ergine (= acide d-lysergique)	*N. coenophialum (F. arundinacea)*	Avec l'ergovaline, dérivé majeur produit *par N. coenophialum* dans la grande fétuque responsable de la toxicose « foot fescue » observée dans l'élevage. Propriétés légèrement vasoconstrictrices et hypoprolactinémiantes. Propriétés psychotropes (129) (79). (Hémi synthèse de la LSD à partir de l'ergine).
	Ergonovine (= ergométrine, = ergobasine)	*N. coenophialum, C. purpurea (Triticum, F. arundinacea, L. perenne)*	Propriétés légèrement vasoconstrictrices et hypo-prolactinémiantes, moins puissant que l'ergotamine (79).

- **Les dérivés indoles-diterpènes**

Dans cette classe dont les voies de biosynthèse sont indiquées en annexe, nous trouvons principalement les lolitrems et la paxilline dont les bioactivités sont décrites dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Les indoles-diterpènes et leurs bioactivités

Classe Chimique	Molécule	Endophyte (plante hôte)	Bioactivité
Indoles-diterpénes			Toxicité importante pour les vertébrés (79).
Indoles-diterpénes	Lolitrem A	*N. lolii – N. coenophialum (F. arundinacea – L. perenne)*	
	Lolitrem B	*N. lolii – N. coenophialum (F. arundinacea – L. perenne)*	Principal responsable du syndrome de Staggers observé chez les mammifères (79).
	Lolitrem C	*N. lolii – N. coenophialum (F. arundinacea – L. perenne)*	
	Lolitrem D	*N. lolii – N. coenophialum/F. arundinacea – L. perenne*	
	Lolitrem E	*N. lolii – N. coenophialum (F. arundinacea – L. perenne)*	
	Paxilline	*N. lolii – N. coenophialum (F. arundinacea – L. perenne)*	Mycotoxine génératrice de tremblements Co-responsable du syndrome de Staggers (79).

- **Les dérivés pyrrolopyrazines**

Dans cette classe dont la voie de biosynthèse est indiquée en annexe, nous retrouvons l'alcaloïde peramine dont la bioactivité est décrite dans le tableau 16.

Tableau 16 : La bioactivité de la peramine

Classe Chimique	Molécule	Endophyte (plante hôte)	Bioactivité
Pyrrolopyrazine			Forte répulsivité sur les insectes (79). Toxicité non démontrée mais probable (79).
Pyrrolopyrazine	Peramine	*N. lolii – N. coenophialum (F. arundinacea – L. perenne)*	Contribue probablement aux toxicoses dues aux dérivés de l'ergot et aux indole-diterpènes (79).

- **Les dérivés lolines**

Les bioactivités des molécules de cette classe sont représentées dans le tableau 17 et la voie de biosynthèse est décrite en annexe.

Tableau 17 : La bioactivité des dérivés lolines

Classe Chimique	**Molécule**	**Endophyte (plante hôte)**	**Bioactivité**
Pyrrolizidines saturées			Toxicité et répulsivité sur les insectes (79). Toxicité sur les vertébrés (hépatotoxicité, inducteur de tumeurs hépatiques) (47). Phytotoxicité (sur jeunes pousses de luzerne) (131).
Pyrrolizidines saturées	N-formylloline	*N. coenophialum (F. arundinacea – L. perenne)*	
	N-acetylloline	*N. coenophialum (F. arundinacea – L. perenne)*	
	N-methylloline	*N. coenophialum (F. arundinacea – L. perenne)*	
	N-acetylnorloline	*N. lolii (F. arundinacea – L. perenne)*	

2.1.1.1. Conséquences phénotypiques sur l'hôte

Ces champignons augmentent la biomasse racinaire des plantes colonisées permettant un meilleur prélèvement de l'eau et des nutriments du sol (132). Ils diminuent le diamètre racinaire et augmentent la longueur des poils racinaires lors d'un stress par déficit phosphorique (133). Il en résulte une meilleure tolérance à la sécheresse et une meilleure récupération en cas de stress hydrique.

Ils permettent également une augmentation de l'exsudat racinaire (eau, carboxylates, composés phénoliques) dans la rhizosphère (134). Il en résulte la chélation et la séquestration d'ions aluminium, fer et manganèse. Ces ions pouvant rendre le phosphore de la rhizosphère indisponible par complexation, leur chélation facilite le prélèvement du phosphore (132) (135) (134).

Les espèces de *Neotyphodium* seraient également responsables d'une protection de la plante contre le stress oxydant et ce grâce à la production d'un large panel de composés antioxydants par le champignon, mais aussi par la stimulation secondaire de la production de défenses antioxydantes par la plante. Cela permet une meilleure résistance au stress abiotique et aux champignons phytopathogènes (136).

Neotyphodium coenophialum entraine l'augmentation du nombre et du taux de croissance des pousses de *Festuca arundinacea* (137).

Tout cela contribue à une meilleure compétitivité des plantes colonisées (138).

La présence d'endophyte peut également induire un impact négatif pour l'hôte :

La présence d'endophyte semble parfois provoquer une diminution de la tolérance de certaines plantes hôtes à la présence de pathogènes. L'explication la plus probable serait le coût de la présence de l'endophyte en nutriments pour l'hôte qui s'ajoute au stress induit par le pathogène. La présence des deux organismes colonisateurs représente un surcoût en nutriments pour l'hôte, probablement responsable de la présence de symptômes plus sévères chez ces plantes. Ce fait a été observé avec les pathogènes *Pythium graminicola* (30), *Typhula ishikariensi*s (139) en présence d'endophytes du genre *Epichloë*.

Les endophytes des genres *Epichloë* ou *Neotyphodium* peuvent diminuer les glucides disponibles de l'hôte. Ils hydrolysent et consomment les glucides provenant de l'espace apoplastique des feuilles de l'hôte (140). La diminution de l'accumulation des glucides pourrait expliquer la diminution de la tolérance de l'hôte aux pathogènes.

2.1.1.2. Conséquences sur les plantes environnantes

Les alcaloïdes de type loline possèdent des propriétés allélopathiques (134). Il a été observé une phytotoxicité sur *Lolium perenne* et sur *Medicago sativa* due à ces molécules. Cette phytotoxicité se traduit par une diminution de la germination et de la croissance des jeunes pousses (131). Il est possible que les dérivés lolines relargués dans la rhizosphère de la plante hôte soient responsables d'effets allélopathiques délétères sur les plantes environnantes.

Des effets allélopathiques ont également été attribués aux composés phénoliques (toutes classes de composés phénoliques confondues). Ces composés ont un impact sur plusieurs

processus physiologiques impliqués dans le maintien d'un équilibre osmotique favorable, la régulation du taux de photosynthèse, du métabolisme respiratoire et de la sphère hormonale des plantes environnantes. Ainsi, la colonisation par *Neotyphodium coenophialum* de *Festuca rubra* augmente les propriétés allélopathiques de la plante. L'explication la plus probable serait l'augmentation de la quantité de composés phénoliques relargués dans la rhizosphère (141).

La litière organique issue des plantes colonisées par *Neotyphodium coenophialum* inhibe l'établissement des plantes environnantes (142).

Neotyphodium coenophialum serait responsable d'une altération de la diversité de la flore environnante de la grande fétuque (34).

2.1.1.3. Conséquences sur les animaux et les microorganismes de l'environnement

La défense des plantes face aux herbivores (vertébrés et invertébrés), aux microorganismes pathogènes est en partie médiée par deux voies métaboliques : celle de l'acide salicylique et celle de l'acide jasmonique. La voie de l'acide salicylique influe sur la défense de la plante aux pathogènes biotrophiques et quelques insectes suceurs de sève. La voie de l'acide jasmonique influe sur la défense de la plante aux pathogènes nécrotrophiques et aux herbivores (Figure 29) (143). Les champignons endophytes pourraient activer la voie de l'acide salicylique et indirectement, par la stimulation de cette voie, induire une résistance aux insectes suceurs de sève et aux pathogènes biotrophiques. Les deux voies étant antagonistes (144), la voie de l'acide jasmonique serait secondairement inhibée, une diminution des défenses face aux herbivores et pathogènes nécrotrophiques doit être attendue. Mais les endophytes de classe 1 offrent des mécanismes de défenses alternatifs face à ces agresseurs *via* la production de métabolites secondaires. Les plantes colonisées bénéficient donc d'une défense optimisée, face à un spectre d'agresseurs plus large.

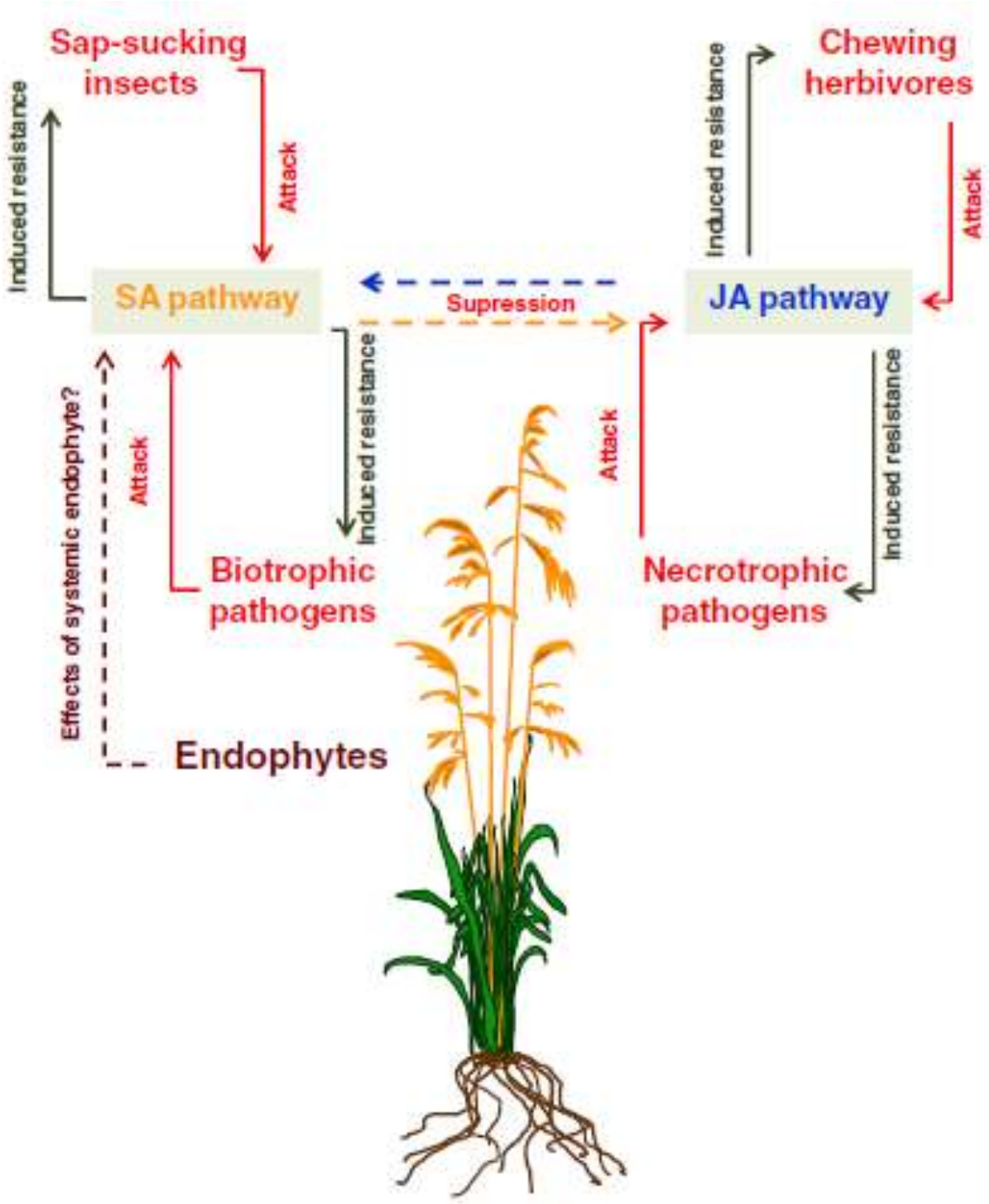


Figure 29 : L'impact des champignons endophytes de classe 1 sur deux voies métaboliques : la voie de l'acide jasmonique et la voie de l'acide salicylique (145)

Par ailleurs, il a été observé que les endophytes du genre *Neotyphodium* diminuent la colonisation des racines de *Festuca arundinacea*, *Lolium perenne* et *Lolium annuum*, par des champignons mycorhiziens. Le sol des prairies subalpines abritant des quantités importantes d'endophytes *Neotyphodium* sp. serait toxique sur les champignons mycorhiziens et diminuerait

le nombre de propagules dans le sol et le taux de colonisation racinaire des plantes hôtes cultivées dans ce sol (34).

Sur la flore microbienne du sol, la présence de la grande fétuque colonisée par des endophytes induit une diminution de la décomposition de la litière organique du sol (146).

Il a été observé qu'*Epichloë festucae* inhibe la croissance d'autres champignons *in vitro*. Des effets similaires ont été observés *in situ* en particulier. Des gazons colonisés par des champignons endophytes présentent une résistance plus importante face à plusieurs espèces de champignons pathogènes due à la production de composés antifongiques par l'endophyte, la compétition trophique entre les microorganismes ou encore l'exclusion physique par occupation de l'espace par l'endophyte (30) (147) (148) (149).

Les conséquences sur les animaux et les microorganismes s'observent généralement par une toxicité/répulsivité de certains métabolites secondaires. Ces molécules produites par les champignons endophytes issus des Clavicipitaceae comprennent notamment les dérivés de l'ergot et indoles-diterpènes qui affectent principalement les vertébrés ainsi que la peramine qui affecte principalement les invertébrés. Les dérivés de type loline et clavine affectent aussi bien les vertébrés que les invertébrés (150). Ainsi, des plantes résistant à la prédation par les insectes du fait de l'effet insecticide et répulsif des alcaloïdes de type loline et de l'effet répulsif de la peramine ont été observées (79). De la même manière, des attitudes d'évitement observées chez des animaux avec des plantes colonisées par des endophytes producteurs de dérivés clavines et de l'ergot ont été décrites (30) (151).

En agriculture, quelques plantes fourragères colonisées par des souches de *Neotyphodium* sont responsables d'une fréquence très importante de toxicoses chez les mammifères, avec un impact économique délétère dans le secteur de l'élevage (tableau 18).

Tableau 18 : Les syndromes toxiques majeurs induits par des champignons endophytes observés en particulier dans l'élevage

Description **Toxicose**	**Symptomatologie**	**Toxines ***	**Endophyte producteur (Plante hôte)**	**Saison Zone**
« Tétanie d'herbage » (*Staggers)*	**Progressifs :** Isolement, tremblements, irritabilité, incoordination, démarche chancelante, coma, mort	Indoles-diterpènes (Lolitrem B, Paxilline, Lolitrems mineurs) (152)	*Neotyphodium lolii (Lolium perenne)* (129)	Fin été – Automne.
Remarques Staggers	Dose toxique du lolitrem B chez le cheval : 5 ppm (153). Les dérivés de l'ergot sont également produits par l'endophyte, mais la concentration en indoles-diterpènes est bien supérieure, bien que ce ratio soit variable en fonction de la génétique de la souche productrice et des conditions environnementales (154). C'est presque toujours la toxicité des indoles-diterpènes qui s'exprime après consommation de la plante (129). La toxicologie du lolitrem B est encore méconnue. Une possible action inhibitrice du système GABA-A est évoquée (155) (156). Une inhibition des canaux potassiques activés par le calcium serait également induite par le lolitrem B et la paxilline (157) (152). Les lolitrems mineurs (A, C, D, E) contribueraient également à la symptomatologie totale du syndrome (79).			
« Pied de fétuque » (foot fescue)	Boiterie des pattes arrière (gauches en particulier). **Rarement :** nécrose distale/perte d'un membre ou d'un organe (patte arrière, queue, oreilles) ***« Summer slump syndrome » :*** performances réduites, gain de poids, fièvre, tachypnée, capacités de reproduction et de production laitière réduites, naissance d'individus affaiblis, recherche d'une place ombragée.	Ergovaline, Ergine (= acide d-lysergique)	*Neotyphodium coenophialum (Festuca arundinacea)* (156)	Mondiale
Remarques Pied de fétuque	Dose toxique de l'ergovaline chez les ovins : 0,4 ppm, bovins : 0,8 ppm (129) (156). Les alcaloïdes dérivés de l'ergot présentent une structure comparable aux amines biogènes : dopamine, noradrénaline et sérotonine. Il y a agonisme partiel des récepteurs D2 des cellules lactotropes de la partie antérieure de l'hypophyse ce qui entraîne l'action hypo-prolactinémiante. L'agonisme partiel des récepteurs 5-HT2 localisés au niveau du muscle lisse des vaisseaux sanguins entraine une vasoconstriction périphérique. Un froid ambiant majore la vasoconstriction et est responsable des tableaux sévères de nécroses distales et de perte de membres. Une température ambiante élevée est difficilement gérée par l'animal intoxiqué de par la vasoconstriction généralisée, délétère pour la régulation thermique de l'organisme (origine du « summer slump syndrome »). Il est important de noter la grande variabilité d'expression de cette toxicose selon le climat. Elle est distribuée mondialement (129).			
« Cheval ivre » (Drunken horse)	dépression, narcose, larmoiements, spasmes musculaires, augmentation du rythme respiratoire et cardiaque	Ergine (= acide d-lysergique), Ergonovine	*Neotyphodium gansuense (Achnatherum inebrians)* (129)	Chine du nord
Remarques Cheval ivre	Uniquement en terrain semi-aride, aride, en prairies sub-alpines et alpines (129).			
« Sleepy grass »	Narcose pouvant durer plusieurs jours	Ergine, Ergonovine	*Neotyphodium (Achnatherum robustum)*	Sud-ouest des Etats-Unis
Remarques Sleepy grass	D'autres biotopes, riches en *Achnatherum robustum*, avec un taux de colonisation proche de 100% par un endophyte du genre *Neotyphodium* se distinguent par l'absence de toxicose manifeste (129).			

* Voies de biosynthèse détaillées en annexes.

2.2. Les endophytes non issus des Clavicipitaceae (classes 2, 3 et 4)

Les endophytes de classe 2, 3 et 4 ont été à ce jour peu étudiés. Ainsi, d'une façon générale, ces endophytes ont été décrits comme apportant un bénéfice à l'hôte contre le stress abiotique. Une facilitation de l'acquisition de nutriments, une amélioration de la croissance et du rendement des plantes hotes ont été observées (30). La production de composés antifongiques et antibactériens par certains endophytes contribuerait également à protéger l'hôte des phytopathogènes et ainsi augmenter sa survie (stress biotique) (158).

Quelques conséquences négatives ont également pu être observées dans la littérature.

Une perte d'eau plus rapide est observée sur des semis de *Theobroma cacao* lors d'une exposition à un stress thermique en présence de ces endophytes.

Une diminution de la photosynthèse a été observée sur une espèce de *Musa* (bananier) en cas de colonisation par *Fusarium moniliforme* (25).

Des effets spécifiques ont été également décrits pour chaque classe.

2.2.1. Endophytes de classe 2

Il semblerait que la plupart des endophytes de classe 2 confèrent aux plantes une augmentation de la biomasse totale (racines et parties aériennes) par l'intermédiaire d'une induction de la biosynthèse de phytohormones par l'hôte ou par une synthèse exogène de ces hormones par le champignon (30).

Ils activent les mécanismes de défense de l'hôte et peuvent conférer des avantages dits "habitats adaptés". Ils offrent une tolérance à plusieurs types de stress abiotiques tels que la sécheresse, la dessiccation, les chocs thermiques ou encore un taux de salinité important du sol (30).

Curvularia protuberata colonise les tissus de la plante géothermale *Dichanthelium lanuginosum*. Cette association mutualiste permet la survie à plus de 65°C de l'hôte et du champignon qui ne résistent habituellement pas à des températures supérieures à 45°C (30).

Fusarium culmorum colonise les tissus de la plante *Leymus mollis.* Cette association permet aux deux partenaires de tolérer des niveaux de salinité non viables pour chacun d'eux sans ce mutualisme (30).

2.2.2. Endophytes de classe 3

Ces endophytes présentent une très grande biodiversité. La multitude d'individus, d'espèces différentes, colonisant simultanément le même hôte rend l'étude de leur impact sur l'écosystème en milieu naturel complexe (30).

2.2.3. Endophytes de classe 4

L'impact des endophytes de classe 4 serait similaire aux mycorhizes : effet non seulement sur l'acquisition de nutriments mais aussi sur la croissance. Ils permettraient également de prévenir l'infection par des parasites phytopathogènes en minimisant la matière organique carbonée disponible dans la rhizosphère. Le taux important de mélanine produit par ces champignons serait impliqué dans la production de métabolites secondaires toxiques pour les herbivores (30). Il conférerait également une protection contre les dommages liés à la dessiccation et aux radiations, notamment les ultra-violets (159).

3. Limites du modèle : les champignons endophytes, des mutualistes ?

Les champignons endophytes présentent en réalité un mode de vie intermédiaire entre un parasitisme et un mutualisme (26). Cela est déterminé par les conditions environnementales et l'état physiologique de l'hôte :

- impact positif : l'endophyte apporte un avantage lié à stress environnemental.
- impact négatif : l'endophyte devient parasite par un surcout en nutriments délétère sur l'hôte.

Il est intéressant de remarquer que chaque individu d'une espèce de champignon peut parfois adopter plusieurs modes de vie au cours de son existence (Figure 30), selon le biotope et les conditions environnementales :

→ un endophyte selon les facteurs environnementaux et l'état physiologique de l'hôte peut devenir parasite.

→ à la mort de l'hôte, certaines souches d'endophytes peuvent devenir saprophytes.

Les conditions environnementales sont déterminantes (Figure 31), c'est pourquoi il est important d'étudier l'impact des champignons endophytes en milieu naturel.

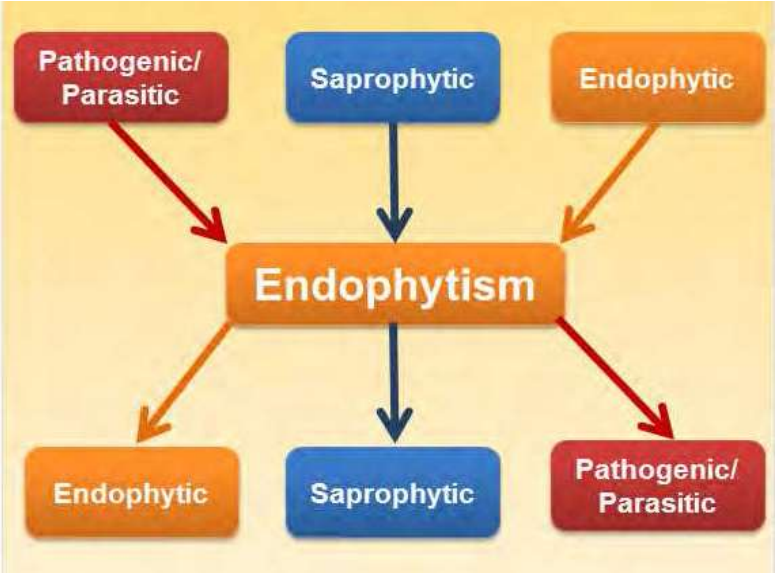


Figure 30 : Les champignons, une existence, plusieurs mode de vie (5)

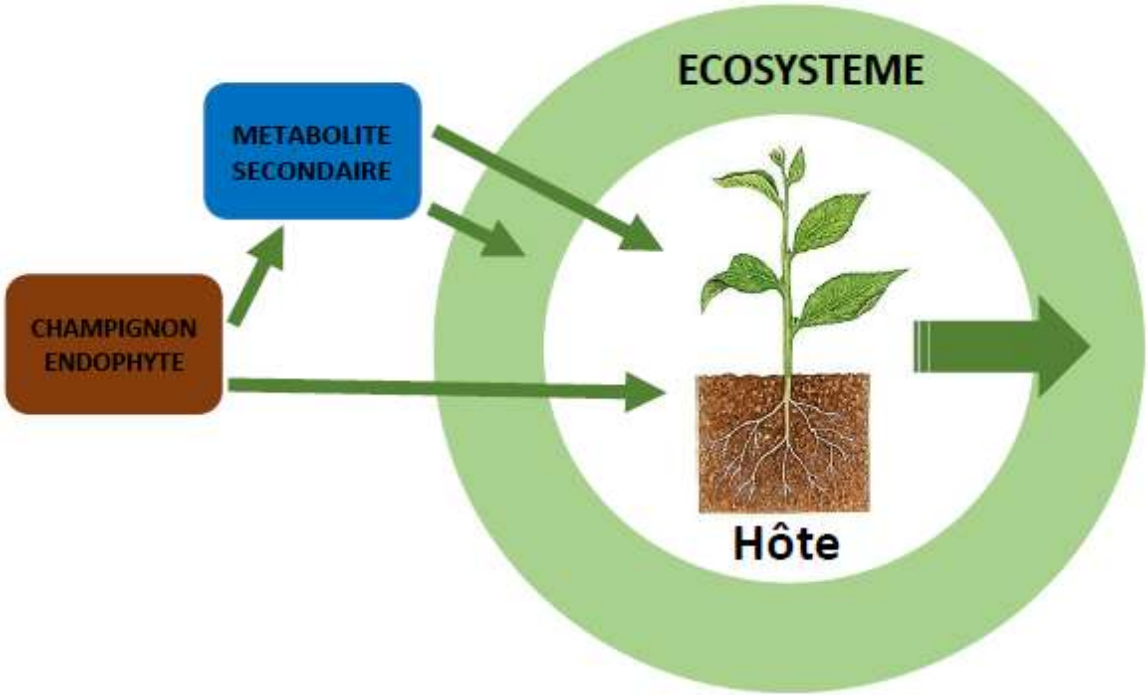


Figure 31 : Les champignons endophytes et l'écosystème
Les champignons endophytes produisent des métabolites secondaires.
Les champignons endophytes ont un impact sur l'hôte par leur présence (coût en nutriments) et par leur production de métabolites secondaires bioactifs.
La modification de la compétitivité de l'hôte a un impact sur l'équilibre de l'écosystème.
Les facteurs environnementaux sont décisifs sur la nature de l'interaction champignon/hôte

THESE SOUTENUE PAR : **Andéol SENEQUIER-CROZET et Benjamin CANARD**

TITRE :

LES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES : IMPACT SUR LES ECOSYSTEMES ET PRODUCTION DE MOLECULES D'INTERET THERAPEUTIQUE

CONCLUSION :

Au cours de cette thèse, nous avons étudié les champignons endophytes afin de mieux cerner leur impact sur le fonctionnement des écosystèmes et leur importance dans le domaine de la thérapie humaine.

Les champignons endophytes sont un groupe polyphylétique très diversifié. Ils sont constitués principalement d'espèces appartenant au phylum Ascomycota et colonisent asymptomatiquement les milieux intra- et extracellulaires des plantes. Ils sont divisés en quatre classes selon la famille d'endophyte concerné, la localisation des tissus colonisés et le mode de transmission. Leur large distribution et le taux de colonisation élevé des tissus végétaux dans tous les écosystèmes suggèrent leur rôle écologique important. Ils agissent notamment sur les plantes hôtes, le plus souvent en augmentant leur productivité ou en améliorant leur tolérance aux stress abiotiques et biotiques. Ils modifient la diversité végétale en augmentant les effets allélopathiques des plantes hôtes principalement *via* la production de métabolites bioactifs. Comprendre l'écologie, l'évolution et l'importance des champignons endophytes est un enjeu majeur en raison du nombre important d'espèces fongiques capables de former des associations de type endophytique et leur caractère unique par rapport aux autres microorganismes associés aux plantes.

Les champignons endophytes sont également capables de produire un très grand nombre de métabolites secondaires de structures chimiques extrêmement différentes et possédant un spectre d'activité pharmacologique très large. On retrouve parmi ces métabolites le paclitaxel (Taxol®) ou la camptothécine à activités anticancéreuses, l'ergotamine à activité antimigraineuse ou encore la lovastatine à activité hypocholestérolémiante. Malgré cette potentialité remarquable de produire de nombreux métabolites d'intérêt, aucun d'entre eux n'a pour l'instant été exploité en production industrielle, principalement à cause du faible

rendement de production. Plusieurs stratégies sont en cours d'études afin d'isoler de nouvelles souches ou d'améliorer le rendement de production en agissant directement sur des souches ou en optimisant les conditions de culture. Ces stratégies devraient permettre d'utiliser les champignons endophytes pour produire des médicaments à l'échelle industrielle et d'éviter les conséquences écologiques que peuvent provoquer la surexploitation de certaines espèces végétales.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 4 Janvier 2016

LE DOYEN | **LE PRESIDENT DE LA THESE**

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER U.F.R. DE PHARMACIE GRENOBLE 1

Pr. Christophe RIBUOT | **Docteur Mme. Lucile SAGE**

Faculté de Pharmacie,
Université Joseph Fourier Grenoble I.

Serment de Galien

« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

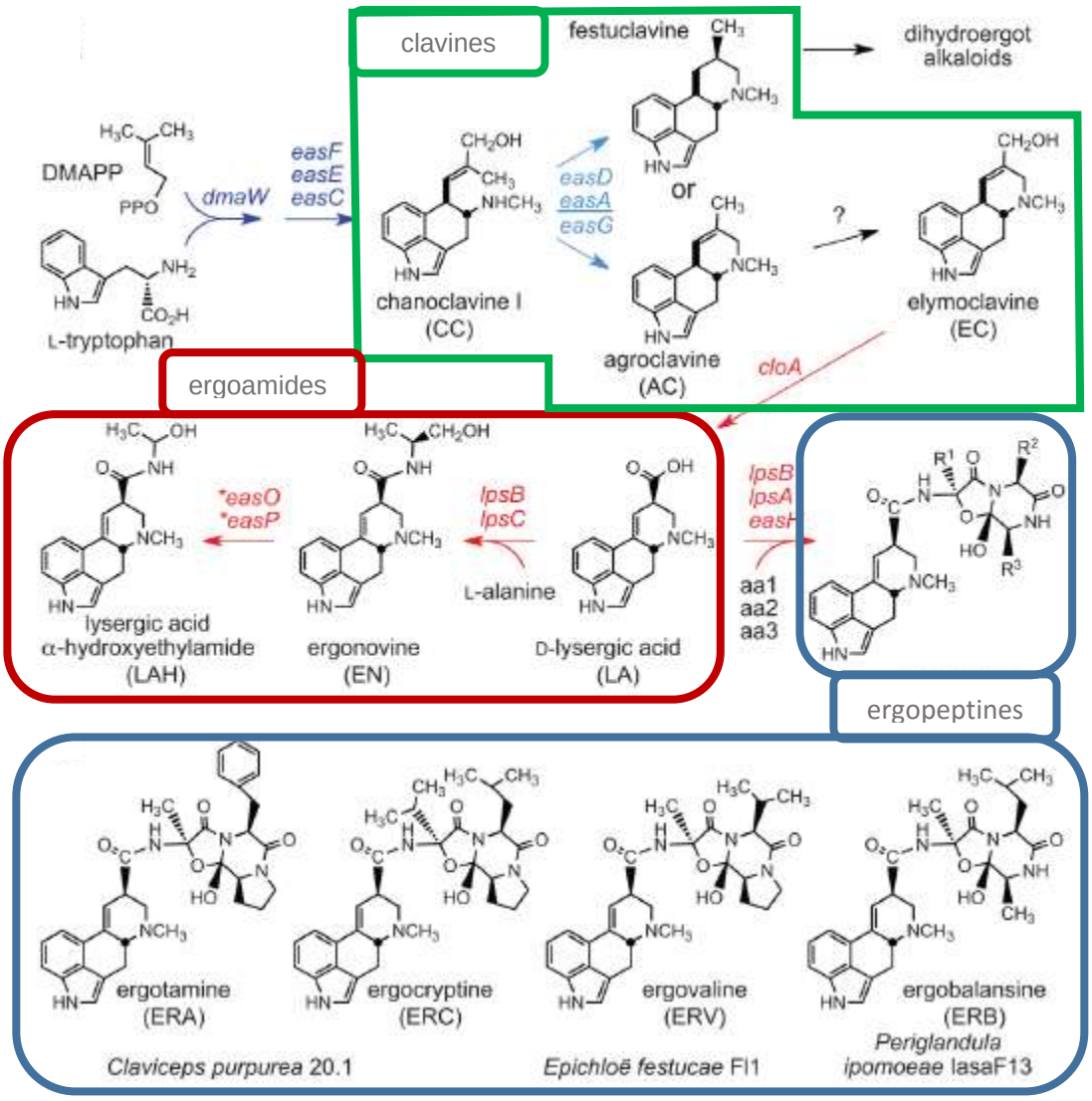
D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

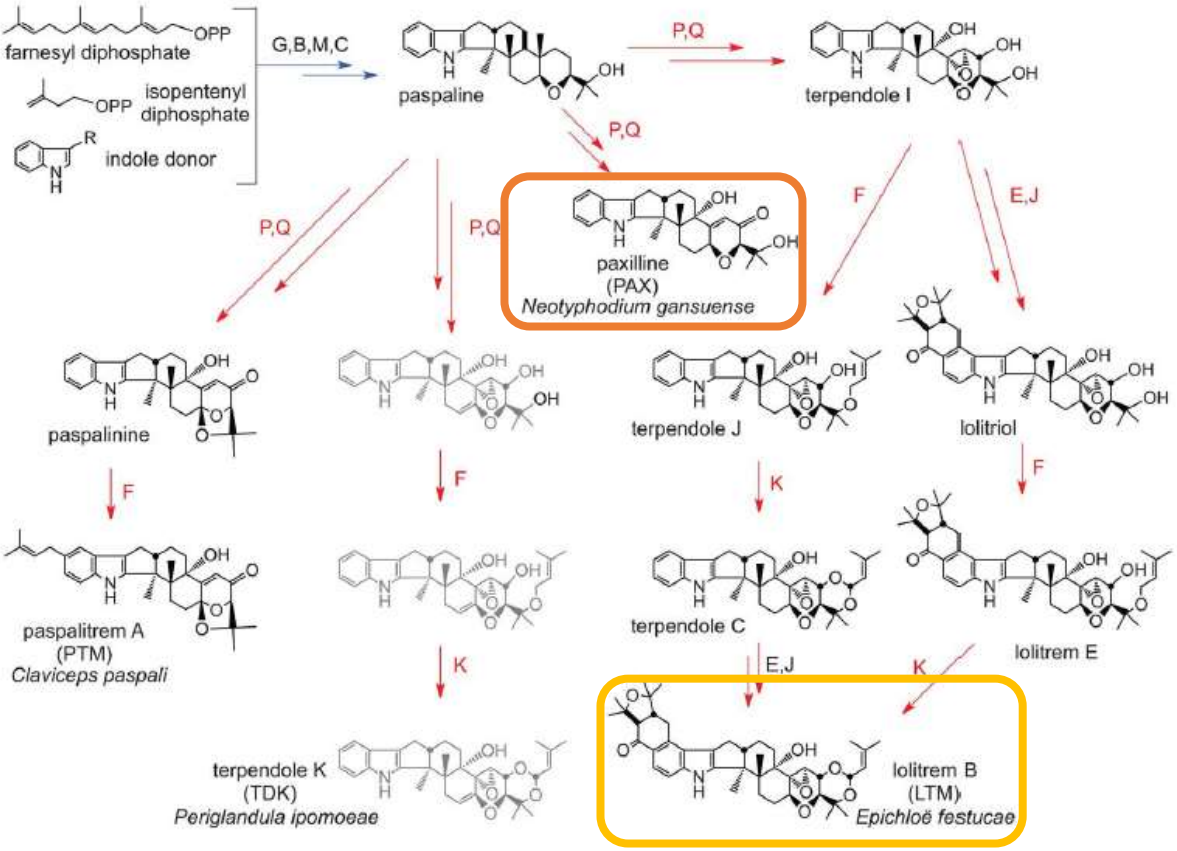
De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

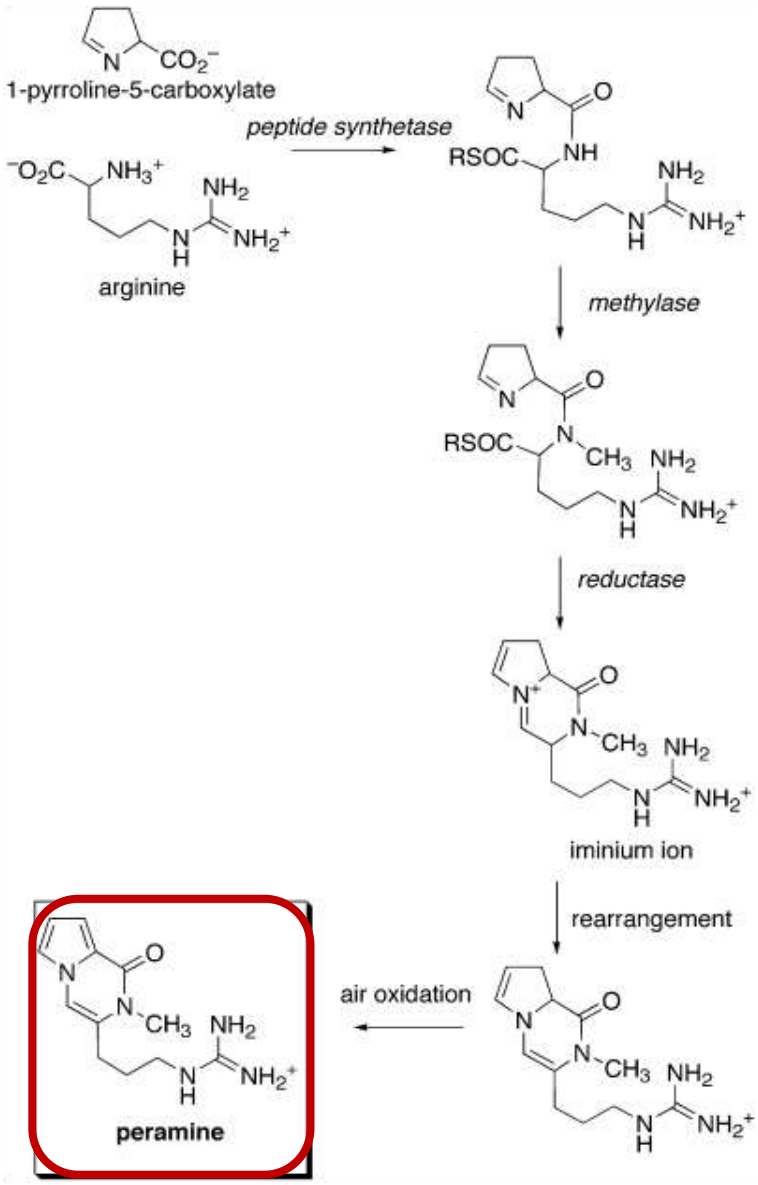
ANNEXES



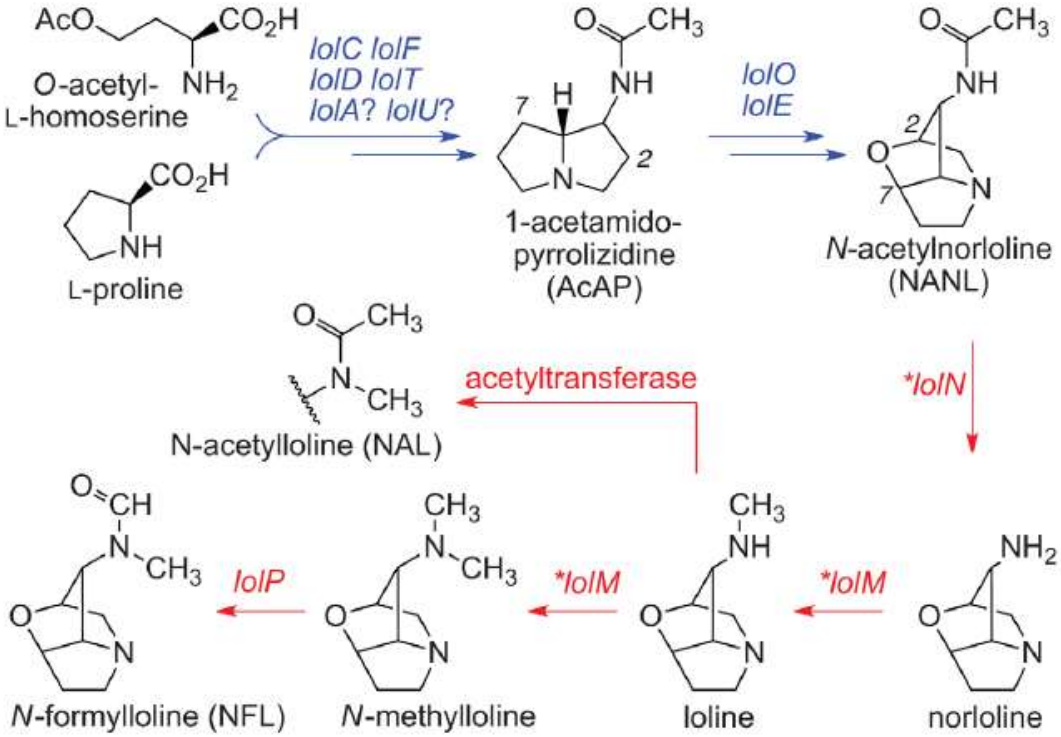
Annexe 1 : Biosynthèse des alcaloïdes clavines et des alcaloïdes dérivés de l'ergot (50)
En vert figurent les dérivés clavines, en rouge figurent les dérivés de l'acide lysergiques (ou ergoamides) et en bleu figurent les ergopeptines. En rouge sont écrits les noms des enzymes constituant la voie de biosynthèse.



Annexe 2 : Biosynthèse des indoles-diterpènes (50)
En jaune figure le lolitrem B et en orange figure la paxilline, ces deux composés étant tout particulièrement bioactifs parmis les indoles-diterpènes. En rouge sont écrits les noms des enzymes constituant la voie de biosynthèse.



Annexe 3 : Biosynthèse des pyrrolopyrazines (49)
En rouge figure la peramine.



Annexe 4 : Biosynthèse des alcaloïdes de type loline (50)
En rouge sont écrits les noms des enzymes constituant la voie de biosynthèse.

REFERENCES

1. De Bary A. Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten. **1866**
2. Guerin P. Sur la présence d'un champignon dans l'ivraie. *J Bot*. **1898**
3. Redecker D, Kodner R, Graham LE. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*. **2000** ; 289(5486) : 1920–1
4. Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*. **1993** ; 260(5105) : 214–6
5. Kusari S, Spiteller M. Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites : progress, challenges and opportunities. *Metabolomics*. **2012** ; (1866) : 241–66
6. Kusari S, Hertweck C, Spiteller M. Chemical ecology of endophytic fungi : origins of secondary metabolites. *Chem Biol*. **2012** ; 19(7) : 792–8
7. O'Brien HE, Parrent JL, Jackson J A, Moncalvo J, Vilgalys R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl Environ Microbiol*. **2005** ; 71(9) : 5544–50
8. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, et al. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol Res*. **2007** ; 111(5) : 509–47
9. Larsson R. Identification of Microsporidia. *Acta Protozool*. **1999** ; 38(3) : 161–97
10. Desportes I, Le Charpentier Y, Galian A, Bernard F, Cochand-Priollet B, Lavergne A, et al. Occurrence of a new microsporidan : *Enterocytozoon bieneusi n.g., n. sp.*, in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J Protozool*. **1985** ; 32(2) : 250–4
11. ANOFEL - Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie. Microsporidiose [Internet] http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/protozooses/site/html/3.html
12. James TY, Letcher PM, Longcore JE, Mozley-Standridge SE, Porter D, Powell MJ, et al. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia*. **2006** ; 98(6) : 860–71
13. Halary S, Malik SB, Lildhar L, Slamovits CH, Hijri M, Corradi N. Conserved meiotic machinery in *Glomus spp.*, a putatively ancient asexual fungal lineage. *Genome Biol Evol*. **2011** ; 3(0) : 950–8
14. Redecker D, Raab P. Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi) : recent developments and new gene markers. *Mycologia*. **2006** ; 98(6) : 885–95
15. Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JP. Ploughing up the wood-wide web? *Nature*. **1998** ; 394(6692) : 431
16. Ainsworth GC, Hawksworth DL, Bisby GR. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. (10ème édition), *CAB International*, **2008,** 771 p
17. Harms H, Schlosser D, Wick LY. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat Rev Microbiol*. **2011** ; 9(3) : 177–92
18. Legault D. Mycoflora of Pinus banksiana and Pinus resinosa needles. II. Epiphytic fungi. *Can J Bot*. **1989** ; 67(Bell 1974) : 2061–5
19. Selosse M, Le Tacon F. The land flora : a phototroph-fungus partnership? *Trends Ecol Evol*. **1998** ; 13(1) : 15–20

20. Sidhoum W. Diversité des mycorrhizes arbusculaires chez la variété « Sigoise » d'olivier (*Olea europea L.*) : étude de leurs efficacités sur la croissance des plants. Mémoire de magistère. Université d'Oran es-senia, **2011** ; 182 p

21. Caron M. Potential use of mycorrhizae in control of soil-borne diseases. *Can J Plant Pathol*. **1989** ; 11(2) : 177–9

22. Subramanian KS, Charest C. Influence of arbuscular mycorrhizae on the metabolism of maize under drought stress. *Mycorrhiza*. **1995** ; 5(4) : 273–8

23. Duan X, Neuman D. Mycorrhizal influence on hydraulic and hormonal factors implicated in the control of stomatal conductance during drought. *J Exp Bot*. **1996** ; 47(303) : 1541–50

24. Bacon CW, Porter JK, Robbins JD, Luttrell ES. *Epichloë typhina* from toxic tall fescue grasses. *Appl Environ Microbiol*. **1977** ; 34(5) : 576–81

25. Arnold AE. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biol Rev*. **2007** ; 21(2-3) : 51–66

26. Saikkonen K, Faeth SH, Helander M, Sullivan TJ. Fungal endophytes : a continuum of Interactions with Host Plants. *Annu Rev Ecol Syst*. **1998** ; 29(1) : 319–43

27. Hodgson S, de Cates C, Hodgson J, Morley NJ, Sutton BC, Gange AC. Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. *Ecol Evol*. **2014** ; 4(8) : 1199–208

28. Currie AF, Wearn J, Hodgson S, Wendt H, Broughton S, Jin L. Foliar fungal endophytes in herbaceous plants : a marriage of convenience? In : *Advances in endophytic research (Osono T.).* **2014** : 61–81

29. Clay K, Schardl C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *Am Nat*. **2002** ; 160 : S99–127

30. Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman RS. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol*. **2009** ; 182(2) : 314–30

31. Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the Clavicipitaceous fungi. *Stud Mycol*. **2007** ; 57 : 5–59

32. NCBI. National Center for Biotechnology Information. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=34397. Consulté le **10/10/15**

33. White JF, Reddy P V, Bacon C W. Microbial endophytes : biotrophic endophytes of grasses : a systematic appraisal. **2000** : 49–62

34. Binet MN, Sage L, Malan C, Clément JC, Redecker D, Wipf D, et al. Effects of mowing on fungal endophytes and arbuscular mycorrhizal fungi in subalpine grasslands. *Fungal Ecol*. **2013** ; 6(4) : 248–55

35. Eaton CJ, Cox MP, Scott B. What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism? *Plant Sci*. *Elsevier Ireland Ltd*. **2011** ; 180(2) : 190–5

36. Glenn AE, Bacon CW, Price R, Hanlin RT. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia*. **1996** ; 88(3) : 369–83

37. Schardl CL, Craven KD. Interspecific hybridization in plant-associated fungi and Oomycetes : A review. *Mol Ecol*. **2003** ; 12 : 2861–73

38. Sélosse M-A, Gibert A. Des champignons qui dopent les plantes. *La Recherche*. **2011** ; Novembre : 72–5

39. States UD of A. United States Department of Agriculture Agricultural Research Service [Internet]. 2013. Available from: http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=5260&pf=1

40. Tadych M, Bergen M, Dugan FM, White JF. Evaluation of the potential role of water in spread of conidia of the *Neotyphodium* endophyte of *Poa ampla*. *Mycol Res*. **2007** ; 111(Pt 4) : 466–72

41. Higgins KL, Arnold A E, Miadlikowska J, Sarvate SD, Lutzoni F. Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Mol Phylogenet Evol*. **2007** ; 42(2) : 543–55

42. Porras-Alfaro A, Herrera J, Sinsabaugh RL, Odenbach KJ, Lowrey T, Natvig DO. Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. *Appl Environ Microbiol*. **2008** ; 74(9) : 2805–13

43. Spatafora JW, Bushley KE. Phylogenomics and evolution of secondary metabolism in plant-associated fungi. *Curr Opin Plant Biol*. **2015** ; 26(JUNE) : 37–44

44. Spiteller P. Chemical ecology of fungi. *Natural product reports*. **2015** ; 32(7) : 971–93

45. Keller NP, Turner G, Bennett JW. Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol*. **2005** ; 3(12) : 937–47

46. Deacon JW. Fungal Biology, (4ème édition), Wiley-Blackwell, **2005**, 384 p

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

48. Zhanga Y. Alkaloids Produced by Endophytic Fungi: A Review. *Nat Prod Commun*. **2012** ; 7(7) : 963-8

49. Tanaka A, Tapper BA, Popay A, Parker EJ, Scott B. 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.* **2005** ; 57(4) : 1036-50

50. Schardl CL, Young C a, Hesse U, Amyotte SG, Andreeva K, Calie PJ, et al. Plant-symbiotic fungi as chemical engineers: multi-genome analysis of the clavicipitaceae reveals dynamics of alkaloid loci. *PLoS Genet*. **2013** ; 9(2)

51. Khan AL, Hamayun M, Kim YH, Kang SM, Lee JH, Lee IJ. Gibberellins producing endophytic *Aspergillus fumigatus* sp. LH02 influenced endogenous phytohormonal levels, isoflavonoids production and plant growth in salinity stress. *Process Biochem*. **2011** ; 46(2) : 440–7

52. Morot-Gaudry JF, Prat R. Biologie végétale : croissance et developpement, (1ère édition), *Dunod*, **2009**, 256 p

53. De Souza JJ, Vieira IJC, Rodrigues-Filho E, Braz-Filho R. Terpenoids from endophytic fungi. *Molecules*. **2011** ; 16(12) : 10604–18

54. Raghunath R, Radhakrishna A, Angayarkanni J, Palaniswamy M, Nadu T. Production and cytotoxicity studies of lovastatin from *Aspergillus niger* PN2 an endophytic fungi isolated from *Taxus baccata*. *IJABPT*. **2012** ; 3(3) : 342–51

55. Kontnik R, Clardy J. Codinaeopsin, an antimalarial fungal polyketide. *Org Lett*. **2008** ; 10(18) : 4149–51

56. Jayasuriya H, Guan Z, Polishook JD, Dombrowski AW, Felock PJ, Hazuda DJ, et al. Isolation , structure , and HIV-1 integrase inhibitory activity of cytosporic acid , a fungal metabolite produced by a *Cytospora* sp . *J Nat Prod*. **2003** ; 66 : 551–3

57. Lu S, Sun P, Li T, Kurtán T, Mándi A, Antus S, et al. Bioactive nonanolide derivatives isolated from the endophytic fungus Cytospora sp. *J Org Chem*. **2011** ; 76(23) : 9699–710

58. Tambadou F. Étude de la production de peptides non-ribosomiques chez des souches de *Paenibacillus*. Thèse de doctorat d'université. Université de La Rochelle, **2014.** 202p

59. Strobel GA., Miller RV, Martinez-Miller C, Condron MM, Teplow DB, Hess WM. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Microbiology*. **1999** ; 145(1 999) : 1919–26

60. Venugopalan A, Srivastava S. Endophytes as *in vitro* production platforms of high value plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv*. **2015** ; 33(6) : 873–87

61. Dictionnaire Vidal, (91ème édition), *Vidal*, **2015**, 3648p

62. Verma, VC, Gange AC. Advances in endophytic research. *Springer India*, **2014**, 460 p

63. Zhao J, Shan T, Mou Y, Zhou L. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. *Mini Rev Med Chem*. **2011** ; 11(2) : 159–68

64. Zu YG, Tang ZH, Yu JH, Liu SG, Wang W, Guo XR. Different responses of camptothecin and 10-hydroxycamptothecin to heat shock in *Camptotheca acuminata* seedlings. *Acta Bot Sin.* **2003** ; 45(7) : 809–14

65. Sirikantaramas S, Yamazaki M, Saito K. A survival strategy: the coevolution of the camptothecin biosynthetic pathway and self-resistance mechanism. *Phytochemistry*. **2009** ; 70(15-16) : 1894–8

66. Kusari S, Košuth J, Čellárová E, Spiteller M. Survival-strategies of endophytic *Fusarium solani* against indigenous camptothecin biosynthesis. *Fungal Ecol*. **2011** ; 4 : 219–23

67. Sachin N. Do endophytic fungi possess pathway genes for plant secondary metabolites? *Curr Sci.* **2013** ; 104(2) : 178–82

68. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer*. **2006** ; 6(10) : 789–802

69. Stewart L. A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science*. **1998** ; 279(5356) : 1534–41

70. Strumberg D, Pilon AA, Smith M, Hickey R, Malkas L, Pommier Y. Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Mol Cell Biol*. **2000** ; 20(11) : 3977–87

71. Lorence A, Nessler CL. Camptothecin, over four decades of surprising findings. *Phytochemistry*. **2004** ; 65(20) : 2735–49

72. Sawada S. Synthesis of CPT-11 (Irinotecan Hydrochloride Trihydrate). *Ann NEW YORK Acad Sci*. **1996** ; 803 : 13-28

73. Asai N, Ohkuni Y, Kaneko N, Yamaguchi E, Kubo A. Relapsed small cell lung cancer: treatment options and latest developments. *Ther Adv Med Oncol*. **2014** ; 6(2) : 69–82

74. Kingsbury WD, Boehm JC, Jakas DR, Holden KG, Hecht SM, Gallagher G, et al. Synthesis of water-soluble (Aminoalky1) camptothecin analogues : inhibition of topoisomerase I and antitumor activity. *J Med Chem.* **1991** ; 34 : 98–107

75. Caulin C, Vidal recos, (5ème édition), Broché, **2015**, 2559 p

76. Kawato Y, Sekiguchi M, Akahane K, Tsutomi Y, Hirota Y, Kuga H, et al. Inhibitory activity of camptothecin derivatives against acetylcholinesterase in dogs and their binding activity to acetylcholine receptors in rats. *J Pharm Pharmacol*. **1993** ; 45(5) :

444–8

77. Hecht J. Gastrointestinal toxicity or irinotecan. *Oncology*. **1998 ;** 12(8 Suppl 6) : 72-8

78. Oberlies NH, Kroll DJ, Kroll DJ. Invited Reviews, Camptothecin and Taxol : historic achievements in natural products research. *Rev Lit Arts Am*. **2004** ; 129–35.

79. Porter JK. Analysis of endophyte toxins: fescue and other grasses toxic to livestock. *J Anim Sci*. **1995** ; 73(3) :871–80

80. Clay K. Fungal endophytes of grasses : a defensive mutualism between plants and fungi. Ecology. **1988** ; 69 : 10–6

81. Migraine et algies de la face. Collège des Enseignants en Neurologie. http://www.cen-neurologie.fr/2eme-cycle/Maladies%20et%20grands%20syndromes/Migraine%20et%20algies%20de%20la%20face/index.phtml. Consulté le **18/11/2015**

82. Silberstein SD, McCrory DC. Ergotamine and dihydroergotamine: history, pharmacology, and efficacy. *Headache*. **2003** ; 43(2) : 144–66

83. Association Française de formation médicale continue en hépato-gastro-entérologie : migraine et gastro-entérologie. http://www.fmcgastro.org/rubrique/postu-main/page/5/. Consulté le **18/11/2015**

84. Bigal ME, Tepper SJ. Ergotamine and dihydroergotamine: a review. *Curr Pain Headache Rep*. **2003** ; 7(1) : 55–62

85. Tfelt-Hansen P. Ergotamine in the acute treatment of migraine : a review and european consensus. *Brain*. **2000** ; 123(1) : 9–18

86. Cline JKJ. Biomolecules at Kenyon, serotonin (5-HT1B) receptor bound to ergotamine. **2013**. http://biology.kenyon.edu/BMB/jsmol2013/JCJK/index.html. Consulté le **18/11/15**

87. Rodriguez D. Structure-based discovery of selective serotonin receptor ligand structure. **2014** ; 22 : 1140–51

88. Goadsby P. Migraine - current understanding and treatment. *Drug Ther*. **2002** ; 346(4) : 257–70

89. ANSM. Communication aux professionnels de santé concernant les restrictions d'indications des médicaments par voie orale contenant : dihydroergotamine, dihydroergocristine, dihydroergocryptine-caféine, nicergoline. **2013**

90. Roze LV, Linz JE. Lovastatin triggers an apoptosis-like cell death process in the fungus *Mucor racemosus*. *Fungal Genet Biol*. **1998** ; 25(2) : 119–33

91. Cabral ME, Figueroa LIC, Fariña JI. Synergistic antifungal activity of statin-azole associations as witnessed by *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida* utilis-bioassays and ergosterol quantification. *Rev Iberoam Micol*. **2013** ; 30(1) : 31–8

92. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic Effects of Statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **2009** ; 45(8) : 89–118

93. Davignon J, Mabile L. Mécanismes d'action des statines et leurs effets pléiotropes. *Ann Endocrinol*. **2001** ; 62 : 101–12

94. Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation*. **2004** ; 109(III) : III-39 – III-43

95. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*. **1998** ; 97(12) : 1129–35

96. Janusz S. Cell cycle-specific effects of lovastatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1991** ;

88(May) : 3628–32

97. Jani JP, Specht S, Stemmler N, Blanock K, Singh SV, Gupta V, et al. Metastasis of B16F10 mouse melanoma inhibited by lovastatin, an inhibitor of cholesterol biosynthesis. *Invasion Metastasis*. **1993** ; 13(6) : 314–24

98. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*. **1999** ; 286 : 1946–9

99. Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, Luckman SP, Hughes DE, Masarachia PJ, et al. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1999** ; 96(1) : 133–8

100. Wang PS, Solomon DH, Mogun H. HMGCoA Reductase inhibitors and the risk of hip fractures in elderly patients. *JAMA*. **2000** ; 283(24) : 3211–6.

101. Meier CR, Schlienger RG, Kraenzlin ME, Schlegel B, Jick H. HMGCoA reductase inhibitors and the risk of fractures. *JAMA*. **2000** ; 283(24) : 3205–10

102. Tobert JA. Efficacy and long-term adverse effect pattern of lovastatin. *Am J Cardiol*. **1988** ; 62(15) : 28J–34J

103. FDA. Monographie Tablets Mevacor®

104. ANES. Extrait de l'avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif aux risques liés à la présence de levure de riz rouge dans les compléments alimentaires. **2014**

105. Wagner L., Flores H. Effect of taxol and related compounds on growth of plant pathogenic fungi. *Biochem cell Biol*. **1994** ; 84 : 1173–8

106. Horwitz S. Mechanism of action of taxol. *TiPS*. **1992** ; 13(April) : 134–5.

107. Gascoigne KE, Taylor SS. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J Cell Sci*. **2009** ; 122(Pt 15) : 2579–85

108. Weaver BA. How Taxol/Paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell*. **2014** ; 25(18) : 2677–81

109. Wall ME. Camptothecin and taxol : discovery to clinic. *Med Res Rev*. **1998** ; 18 : 299–314

110. Malik S, Cusidó RM, Mirjalili MH, Moyano E, Palazón J, Bonfill M. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: a review. *Process Biochem*. **2011** ; 46(1) : 23–34

111. Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert AK, Krohn K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol Res*. **2002** ; 106(9) : 996–1004

112. Wilson SA, Roberts SC. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnol J*. **2012** ; 10(3) : 249–68

113. Nicolaou K. Total synthesis of taxol. *Nature*. **1994** ; 370 : 621–8

114. Li JY, Strobel G, Sidhu R, Hess WM, Ford EJ. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology*. **1996** ; 142 : 2223–6

115. Strobel G, Yang X, Sears J, Kramer R, Sidhu RS, Hess WM, et al. endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*. **1996** ; 142 : 435–40

116. Pimentel IC, Glienke-Blanco C, Gabardo J, Stuart RM, Azevedo JL. Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merril) under different environmental conditions. *Brazilian Arch Biol Technol*. **2006** ; 49(5) : 705–11

117. Amna T, Puri SC, Verma V, Sharma JP, Khajuria RK, Musarrat J, et al. Bioreactor studies on the endophytic fungus *Entrophospora infrequens* for the production of an anticancer alkaloid camptothecin. *Can J Microbiol*. **2006** ; 52(3) : 189–96

118. Khajuria RK, Sinha RVP, Verma V, Qazi GN et al. Novel composition for early and profuse sporulation in fungi and a method thereof. Brevet. EP1471789 A1. 05/02/2002

119. Priti V. How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites. *Curr Sci*. **2009** ; 97(4) : 477–8

120. Zhou X, Zhu H, Liu L, Lin J, Tang K. A review: Recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. **2010** ; 86(6) : 1707–17

121. Wei Y, Liu L, Zhou X, Lin J, Sun X, Tang K. Engineering taxol biosynthetic pathway for improving taxol yield in taxol-producing endophytic fungus EFY-21 (*Ozonium* sp.). *African J Biotechnol*. **2012** ; 11(37) : 9094–101

122. Kai Z, Zhugang L. Investigation of fermentation conditions and optimization of medium for taxol production from taxol-producing fungi. *J Med Plants Res*. **2011** ; 5(29) : 6528–35

123. Li YC, Tao WY, Cheng L. Paclitaxel production using co-culture of *Taxus* suspension cells and paclitaxel-producing endophytic fungi in a co-bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol*. **2009** ; 83(2) : 233–9

124. Weber SS, Polli F, Boer R, Bovenberg RAL, Driessen AJM. Increased penicillin production in *Penicillium chrysogenum* production strains via balanced overexpression of isopenicillin N-acyltransferase. *Appl Environ Microbiol.* **2012** ; 78(19) : 7107–13

125. Glazer, AN, Nikaido H. Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology, (2ème édition), *Cambridge University Press*, **2007**, p576

126. Scott B, Eaton CJ. Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. *Curr Opin Microbiol*. **2008** ; 11 : 488–93

127. Takemoto D, Tanaka A, Scott B. A p67Phox-like regulator is recruited to control hyphal branching in a fungal-grass mutualistic symbiosis. *Plant Cell*. **2006** ; 18(10) : 2807–21

128. Siegel MR, Latch GCM, Bush LP, Fannin FF, Rowan DD, Tapper BA, et al. Fungal endophyte-infected grasses : alkaloid accumulation and aphid response. *J Chem Ecol*. **1990** ; 16(12) : 3301–15

129. Guerre P. Ergot alkaloids produced by endophytic fungi of the genus *Epichloë*. Toxins. **2015** ; 7(3) : 773–90

130. Cornell CN, Lueker JV, Garner GB, Ellis JL. Establishing ergovaline levels for fescue toxicosis, with and without endoparasites, under controlled climatic conditions. LA : International symposium on *Acremonium*/grass interaction **1990**

131. Petroski RJ, Dornbos DL, Powell RG. Germination and growth inhibition of annual ryegrass (*Lolium multinorum L.*) and Alfalfa (*Medicago sativa L.*) by loline alkaloids and synthetic N-Acylloline derivatives. *J Agric Food Chem*. **1990** ; 38(400) : 1716–8

132. Malinowski DP, Belesky DP. Endophyte infection affects the ability of tall fescue to use sparingly available phosphorus. *J Plant Nutr*. **1999** ; 22(4-5) : 835–53

133. Malinowski DP, Brauer DK, Belesky DP. The endophyte *Neotyphodium coenophialum* affects root morphology of tall fescue grown under phosphorus deficiency. *J Agron Crop Sci*. **1999** ; 183 : 53–60

134. Malinowski DP, Beleslky DP. Adaptations of Endophyte-Infected Cool-Season Grasses to Environmental Stresses: Mechanisms of Drought and Mineral Stress Tolerance. *Crop Sci*. **2000** ; 44(5) : 1507–10

135. Malinowski DP, Alloush GA, Belesky DP. Leaf endophyte *Neotyphodium coenophialum* modifies mineral uptake in tall fescue. *Plant Soil*. **2000** ; 227 : 115–26

136. White JF, Torres MS. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? *Physiol Plant*. **2010** ; 138(4) : 440–6

137. Mersch SM, Cahoon AB. Biomass and tiller growth responses to competition between Ky31 and MaxQ *Festuca arundinacea* cultivars and response of Ky31 to exogenously applied liquid preparation of *Neotyphodium coenophialum* under glasshouse conditions. *Grass Forage Sci*. **2012** ; 67(2) : 299–304

138. Clay K. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science*. **1999** ; 285(5434) : 1742–4

139. Wäli PR, Helander M, Nissinen O, Saikkonen K. Susceptibility of endophyte-infected grasses to winter pathogens (snow molds). *Can J Bot*. **2006** ; 84 : 1043–51

140. Lam CK, Belanger FC, White JF, Daie J. Mechanism and rate of sugar uptake by *Acremonium typhinum*, an endophytic fungus. *Mycol Soc Am*. **1994** ; 86(3) : 408–15

141. Vázquez-de-Aldana BR. Endophytes alter allelopathy in red fescue. *Ann Appl Biol*. **2011** ; 159 : 280–90

142. Omacini M. Asexual endophytes of grasses : invisible symbionts, visible imprints in the host neighborhood. In : *Advances in endophytic research (Osono T.)*. **2014** : 143–57

143. Thaler JS, Humphrey PT, Whiteman NK. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci*. **2012** ; 17(5) : 260–70

144. Ballaré CL. Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. *Trends Plant Sci*. **2011** ; 16(5) : 249–57

145. Saikkonen K, Gundel PE, Helander M. Chemical ecology mediated by fungal endophytes in grasses. *J Chem Ecol*. **2013** ; 39(7) : 962–8

146. Omacini M, Chaneton EJ, Ghersa CM, Otero P. Do foliar endophytes affect grass litter decomposition? A microcosm approach using *Lolium multiflorum*. *Oikos*. **2004** ; 104(February) : 581–90

147. Dingle J, Mcgee P A. Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita f. sp. tritici* in wheat. *Mycol Res*. **2003** ; 107(3) : 310–6

148. Jeffries P, Young TWK. Interfungal parasitic relationships. **1994**

149. Larsen J, Bødker L. Interactions between pea root-inhabiting fungi examined using signature fatty acids. *New Phytol*. **2001** ; 149(3) : 487–93

150. Bultman TL, Rodstrom JL, Radabaugh KR, VanDop JD, Librizzi JM, Longwell LL, et al. Influence of genetic variation in the fungal endophyte of a grass on an herbivore and its parasitoid. *Entomol Exp Appl*. **2009** ; 130(2) : 173–80

151. Panaccione DG, Cipoletti JR, Sedlocks AB, Blemings KP, Schardl CL, Machado C, et al. Effects of ergot alkaloids on food preference and satiety in rabbits, as assessed with gene-knockout endophytes in perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *J Agric. Food Chem.* **2006** ; 54 : 4582−87

152. Imlach WL, Finch SC, Dunlop J, Meredith AL, Aldrich RW, Dalziel JE. The molecular mechanism of "ryegrass staggers," a neurological disorder of K+ channels. *J Pharmacol Exp Ther*. **2008** ; 327 : 657–64

153. Gallagher R, Hawkes A, Stewart J. Rapid determination of the neurotoxin lolitrem B in perennial ryegrass by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr A*. **1985** ; 321 : 217–26

154. Repussard C, Zbib N, Tardieu D, Guerre P. Ergovaline and lolitrem B concentrations in perennial ryegrass in field culture in southern France : distribution in the plant and impact of climatic factors. *J Agric Food Chem.* **2014** ; 62(52) : 12707–12

155. Mantle PG. Amino acid neurotransmitter release from cerebrocortical synaptosomes of sheep with severe ryegrass staggers in New Zealand. *Res Vet Sci.* **1983** ; 34(3) : 373-5

156. Zbib N, Repussard C, Tardieu D, Guerre P. Toxicité des mycotoxines produites par des champignons endophytes du genre *Neotyphodium*. *Rev Méd Vét.* **2014** ; 165(3-4) : 116–35

157. Zbib N. Toxicité de la fétuque élevée et du ray-grass anglais endophytes sur les ovins. *Rev Méd Vét.* **2014** ; 165 : 116–35

158. Soltani J, Hosseyni Moghaddam MS. Fungal endophyte diversity and bioactivity in the mediterranean cypress *Cupressus sempervirens*. *Curr Microbiol*. **2015** ; 70(4) : 580–6

159. Mandyam K, Jumpponen A. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Stud Mycol*. **2005** ; 53 : 173–89

RESUME

SENEQUIER-CROZET Andéol et CANARD Benjamin
Thèse d'exercice soutenue publiquement le 18 janvier 2016, en vue de l'obtention du titre de docteur en pharmacie, filière officine

« LES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES : IMPACT SUR LES ECOSYSTEMES ET PRODUCTION DE MOLECULES D'INTERET THERAPEUTIQUE »

Français :

Les champignons endophytes constituent un groupe polyphylétique très diversifié, principalement constitué d'espèces issues des Ascomycètes. Leur mode de vie se caractérise par une phase dite endophytique consistant en la colonisation asymptomatique des structures internes d'une plante, pendant au moins une partie de leur cycle de vie. Toutes les plantes dans les écosystèmes naturels semblent établir des relations avec des champignons endophytes, des tropiques jusqu'aux pôles. Depuis une cinquantaine d'années, leur étude s'est progressivement intensifiée suite à la découverte d'une part, de leur implication dans de nombreuses toxicoses observées dans l'élevage, et d'autre part de leur capacité à produire une molécule anticancéreuse, le Paclitaxel, principe actif du Taxol®, médicament blockbuster de l'industrie pharmaceutique.

Cette thèse a pour objectif de réaliser un état de l'art sur les champignons endophytes et plus particulièrement leur impact sur le fonctionnement des écosystèmes et leur capacité à produire des molécules d'intérêt thérapeutique.

Nous avons décrit l'impact des endophytes sur le phénotype de l'hôte, sur les végétaux environnants (allélopathie), mais aussi sur les animaux et les micro-organismes en interaction avec les plantes colonisées. Nous avons également étudié les molécules bioactives produites par ces champignons en décrivant quatre molécules d'intérêt thérapeutique à haute valeur ajoutée. Enfin, nous avons abordé les aspects biotechnologiques en décrivant les différentes stratégies pour l'optimisation de la production de ces molécules.

English:

Fungal endophytes are a diverse polyphyletic group, mainly composed of species from Ascomycetes. Their way of life is characterized by an endophytic phase they colonize host plants asymptomatically, for at least one part of their life cycle. All plants in natural ecosystems interact with endophytic fungi. For fifty years, there has been a growing interest in their study following the discovery of their involvement in many toxicosis observed in cattle and also their capacity to produce an anticancer drug, paclitaxel, the active ingredient of Taxol®, a blockbuster drug in pharmaceutical industry.

This work aims at achieving a state of the art on endophytic fungi and especially their impact on the ecosystems and their ability to produce therapeutic substances.

We have described the impact of endophytes on host phenotypes, on the surrounding plants (allelopathy), but also on animals and microorganisms interacting with colonized plants. We also studied the bioactive molecules produced by these fungi by describing four therapeutic substances with high added value. Finally, we discussed the biotechnological aspects describing the different strategies for optimizing the production of these molecules.