

**ANTIMITOTIC AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITIES OF CRUDE FUNGAL
EXTRACTS OF ENDOPHYTIC FOLIAR FUNGI OF *PEGANUM HARMALA* L.
FROM DAYATE AIAT (LAGHOUE, ALGERIA)**

Y. Ouzid^{1,2*}, N. Smail-Saadoun¹, K. Houali²

¹Laboratoire Ressources Naturelles, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie

²Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB), Université Mouloud
Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie

Received: 05 November 2018 / Accepted: 01 March 2019 / Published online: 01 May 2019

Abstract

Medicinal plants are an inexhaustible source of bioactive molecules. They can be produced by the various organs of the plant or by mutual endophytic fungi present within the latter. It is with this in mind that we were interested in a spontaneous plant in the arid zones of Algeria (Laghouat): *Peganum harmala* L. Our interest in this work focused on the demonstration of the antimitotic and antiproliferative activities of the extracts. Cranial fungi of the genera *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* and *Penicillium*: endophytic foliar fungi of *Peganum harmala* L. and their different combinations. The extraction of crude fungal secondary metabolites was carried out using ethyl acetate. The results confirm their action in inhibiting mitosis, as well as the combinations of extracts made, thus producing chromosomal and cellular abnormalities. Tests on *Saccharomyces cerevisiae* also indicate the presence of antiproliferative activity of the various fungal extracts, thus reflecting a cytotoxic effect.

Key words: *Peganum harmala* L., foliar endophytic fungi, fungal extracts, antimitotic activity, antiproliferative activity, Laghouat (Algeria).

Author Correspondence, e-mail: houalitizi@yahoo.fr

doi: <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v11i2.3>



1. INTRODUCTION

Les plantes médicinales constituent une source inépuisable de molécules bioactives. Ces dernières génèrent des activités biologiques. Ces plantes sont colonisées par des mycoendophytes, qui sont des champignons mutualistes vivant dans les tissus de la plante et ne causant aucun symptôme de maladie apparente. Ils sont capables de fournir eux aussi des métabolites secondaires, ayant des activités biologiques. Ces mycoendophytes qui résident dans les tissus des plantes, sont des sources relativement peu étudiées et potentielles de nouveaux produits naturels pour une exploitation en médecine, en agriculture et même en industrie. Les produits naturels des endophytes fongiques ont un large spectre d'activités biologiques et peuvent être regroupés en plusieurs catégories ; nous pouvons citer : les alcaloïdes, les stéroïdes, les terpénoïdes, les flavonoïdes, les glycosides, les xanthones, les isocoumarines, les quinones, les phénylpropanoïdes, les lignanes, les métabolites aliphatiques, les lactones, etc... [1]. Les interactions métaboliques en continu entre le champignon et la plante peuvent améliorer la synthèse de métabolites secondaires avec de nouvelles propriétés [2].

Les champignons endophytes sont un groupe peu étudié de microorganismes qui représentent une source abondante de nouveaux composés bioactifs [3]. C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés aux champignons endophytes des feuilles d'une plante spontanée de la région des dayas (Laghouat, Algérie) : *Peganum harmala* L. ou « Alharmel ». Elle est abondante dans les zones subdésertiques d'Afrique du Nord, dans certaines régions d'Europe, en Asie et dans le sud de la Russie [4]. Ses différentes parties sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies humaines telles que le lumbago, l'asthme, les coliques, la jaunisse et comme stimulant emménagogue [5]. Elle a également des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, antidiabétiques, antitumorales, antileishmania, insecticides et des activités cytotoxiques, ainsi que des effets hépato-protecteurs [6]. Ces activités biologiques sont essentiellement dues à la présence d'une quantité importante en alcaloïdes condensée principalement dans les graines [7]. Au cours des dernières décennies, plus d'attention a été donnée à ses activités anticancéreuses [8, 9,10].

Dans la présente étude, nous nous intéressons à l'évaluation de (i) l'activité antimittotique, mais aussi de (ii) l'activité antiproliférative des extraits bruts des mycoendophytes de cette

essence, appartenant aux genres *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium* : champignons endophytes les plus abondants au niveau des feuilles de *Peganum harmala* L. de dayate Aiat (Laghouat, Algérie).

2. MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal

Les feuilles de dix sujets sains de *Peganum harmala* L. ont été récoltées au mois d'avril 2015 de manière aléatoire. L'échantillonnage a été effectué à dayate Aiat, région de Timzerth, wilaya de Laghouat (Algérie) (Figure 1). Les échantillons ont été placés dans des enveloppes et conservés au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation au laboratoire.

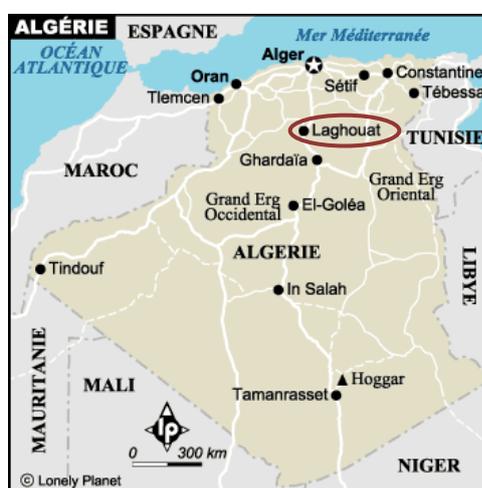


Fig.1. Situation géographique de la zone d'étude

Isolement et identification des champignons endophytes

Une stérilisation superficielle a été réalisée selon le protocole de Schulz et al. [11], afin d'éliminer les organismes épiphytes qui demeurent au niveau du phylloplan. Pour cela, des feuilles sont détachées et lavées à l'eau courante, afin d'éliminer les poussières et les débris. Chaque échantillon est traité avec de l'éthanol 95% pendant 2 min, suivi d'un traitement à l'eau javellisée pendant 3 min, puis un deuxième traitement à l'éthanol 95% pendant 30 sec. Entre ces trois traitements, nous procédons à un rinçage à l'eau distillée stérilisée. Cinq fragments de 5 à 7 mm de la même feuille et quinze feuilles par sujet sont ensemencés sur milieu PDA, additionné de chloramphénicol pour éviter la prolifération intempestive de bactéries, suivi d'une incubation à l'obscurité et à température ambiante pendant une semaine.

Après incubation, nous procédons à l'isolement et l'identification morphologique macroscopique et microscopique des genres fongiques, à savoir la morphologie des hyphes, présence ou absence de septations, forme et regroupement des conidies et spores (solitaires, chaîne, bouquet...), ainsi que les caractères morpho-culturels sur PDA (contours, couleur, relief, transparence, aspect de la surface et taille) [12, 13,14, 15].

Fermentation et extraction des métabolites secondaires fongiques bruts

Après identification, les champignons endophytes concernés ultérieurement sont les plus abondants. Ils ont été mis à croître sur du PDA à température ambiante pendant sept jours, deux à trois pièces (0.5 x 0.5 cm) de chaque champignon ont été inoculées dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 100 ml de PDB (potato dextrose broth), avec deux répétitions [16]. Ils seront ensuite incubés à température ambiante pendant trois à quatre semaines, avec une agitation périodique à 150 tours/minute pendant 1 à 2 heures. Par la suite, le contenu est filtré à travers une gaze stérile, afin de séparer le mycélium du bouillon de culture [17,18]. Ce dernier est centrifugé à 5000 tours/min pendant 15 min, et le surnageant a été récupéré [19].

L'extraction a été faite par l'acétate d'éthyle, meilleur solvant d'extraction des métabolites secondaires fongiques selon Badji et al. ; Gogoi et al. et Qin et al. [20, 21, 22]. A chaque filtrat, nous rajoutons un volume égal de solvant et nous le mettons sous agitation pendant 30 min à 40°C. La solution est ensuite mise au repos dans des ampoules à décanter pour séparer les deux phases. La phase organique a été récupérée pour être concentrée sous pression par évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif à 45°C [18, 23].

Activité antimicrobienne

La méthode adoptée par Shweta et al. [24] a été utilisée pour la détermination de l'activité antimicrobienne, en utilisant les racines d'*Allium cepa*. Des bulbes d'*Allium cepa* ont été mis à germer dans l'eau pendant 48 heures, à température ambiante. Les extrémités des racines uniformes ont été sélectionnées pour notre étude. Ces dernières ont été mises dans les extraits fongiques bruts des mycoendophytes recensés, à savoir : *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium* pris seuls et les combinaisons des extraits d'*Aspergillus* et de *Penicillium*, d'*Alternaria* et de *Cladosporium*, de *Cladosporium* et de *Penicillium*, d'*Alternaria* et d'*Aspergillus*, de *Cladosporium* et d'*Aspergillus* et enfin d'*Alternaria* et de

Penicillium pendant 48 heures. Quelques pointes de racines aussi ont été mises dans de la colchicine utilisée comme standard. Après 48h, les pointes des racines ont été fixées dans une solution composée d'acide acétique et d'alcool (1:3). Les racines ainsi fixées sont colorées par du carmin acétique. La morphologie des cellules a été observée au microscope (40X). Pour un total de 400 cellules méristématiques d'*Allium cepa*, les cellules qui apparaissent dans différentes étapes de la mitose, à savoir l'interphase et la prophase (P), la métaphase (M), l'anaphase (A) et la télophase (T) ont été comptées. L'indice mitotique a été calculé selon la formule suivante [24, 25] :

$$\text{Indice mitotique} = \frac{P + M + A + T}{\text{Nombre total des cellules}} \times 100$$

Activité antiproliférative

L'évaluation de l'activité antiproliférative de l'extrait fongique a été effectuée suivant le protocole de Shweta et al. [24], utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle de cellule eucaryote. La préparation de l'inoculum de levure a été réalisée dans du PDB, incubé à 37°C pendant 24 heures.

Pour la détermination de la viabilité cellulaire, nous avons préparé 13 tubes contenant chacun d'eux 2,5 ml de PDB et 0,5 ml d'inoculum de levure. Dans le premier tube, nous avons rajouté de l'eau distillée, dans le deuxième la quercétine en tant que standard (1 mg/ml), dans le troisième la colchicine comme second standard. Dans les 10 tubes, nous avons rajouté les extraits fongiques bruts seuls et les différentes combinaisons données plus haut. Tous les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, nous avons rajouté dans tous les tubes du bleu de méthylène (0.1%). Le nombre des cellules ainsi que leur couleur sont observés sous microscope optique. Les cellules ovales transparentes sont des cellules vivantes, par contre celles colorées en bleu sont des cellules mortes. Leur comptage est effectué dans 16 chambres de hémocytomètre et le nombre moyen de cellules a été calculé. Le pourcentage de la viabilité cellulaire a été calculé en utilisant la formule [26] :

$$\% \text{ cytotoxicité} = \frac{\text{Nombre de cellules mortes}}{\text{Nombre de cellules mortes} + \text{nombre de cellules vivantes}} \times 100$$

Analyse Statistique

Les indices mitotiques et les pourcentages de cytotoxicité ont été calculés. Des analyses de

variance (ANOVA) ont été réalisées, afin de mettre en évidence l'existence de différences significatives entre les extraits et les standards utilisés. Un test complémentaire de comparaisons multiples des moyennes a été fait pour classer les différents extraits fongiques testés en groupes homogènes.

3. RESULTATS

Les champignons endophytes au niveau des feuilles de *Peganum harmala* L. de dayate Aiat (Laghouat, Algérie) ont été isolés et identifiés. La détermination des genres fongiques s'est basée sur les caractéristiques morphologiques macroscopiques et microscopiques. Les genres *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium* sont les plus abondants (Figure 2).

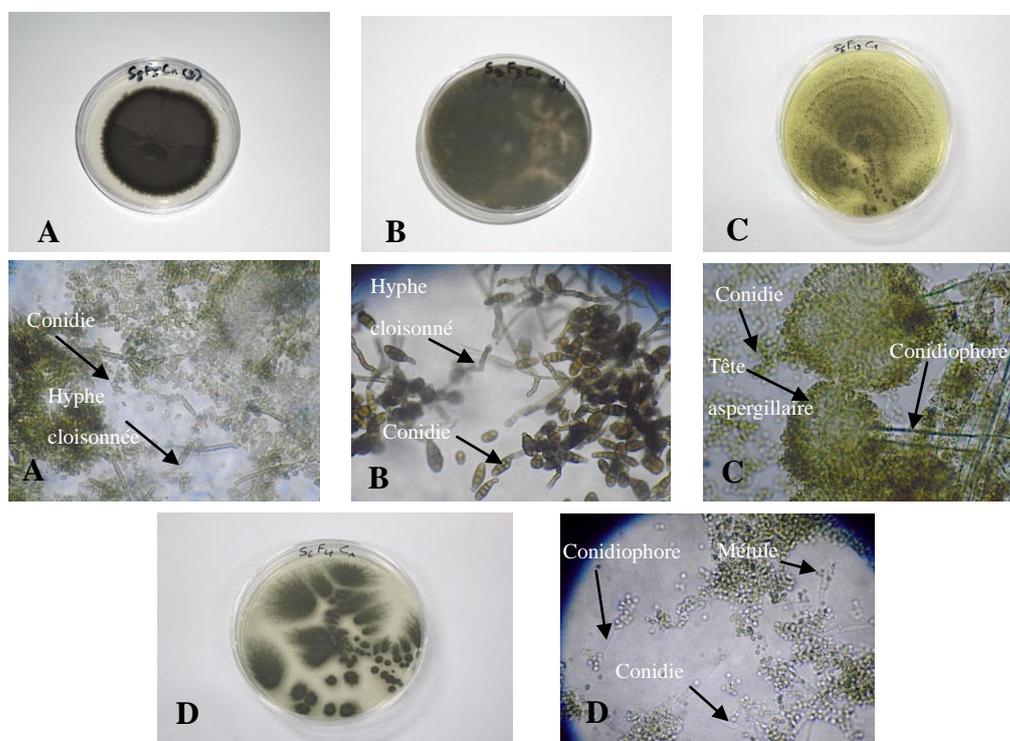


Fig.2. Genres de champignons endophytes les plus abondants au niveau des feuilles de *Peganum harmala* L., observations sous microscope optique (X2000) et boîtes de Pétri à l'œil nu. A : *Cladosporium*, B : *Alternaria*, C : *Aspergillus* et D : *Penicillium*

Les essais antimitotiques ont révélé que les extraits fongiques bruts des différents genres, ainsi que les différentes combinaisons d'extraits présentent une inhibition de la division des cellules méristématiques, à différents stades du cycle cellulaire. Comparativement aux phases mitotiques normales (Figure 3), nous avons constaté un rétrécissement des cellules, une distribution chromosomique anormale à la métaphase, des agglutinations chromosomiques à l'anaphase, une dégénérescence chromosomique, ainsi que des cellules gigantesques (Figures 4 et 5).

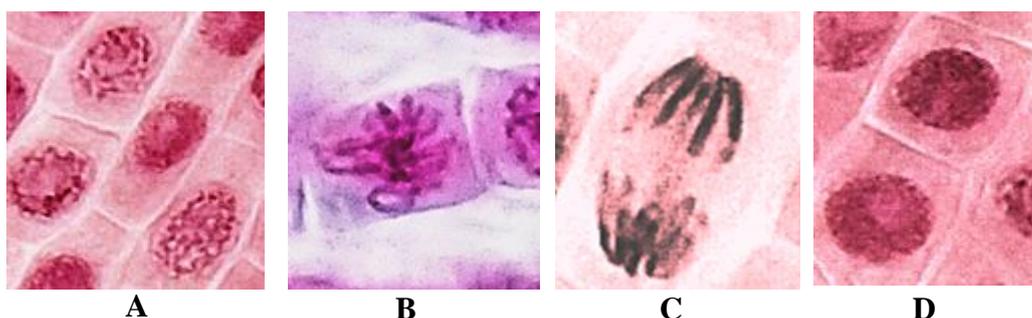


Fig.3. Phases mitotiques normales : A) Prophase, B) Métaphase, C) Anaphase, D) Télouphase (X720)

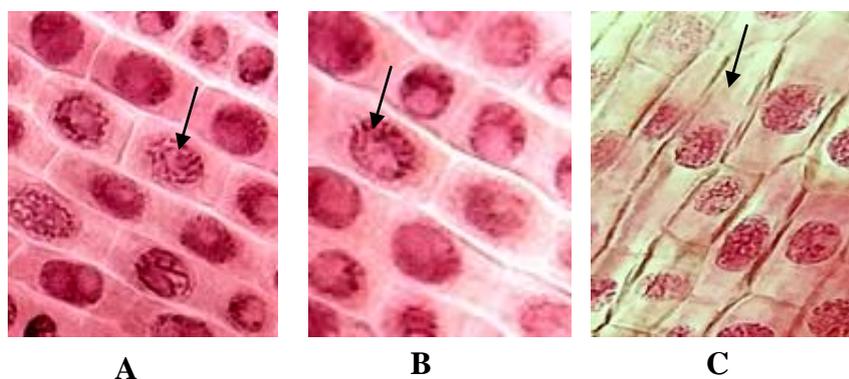


Fig.4. Anomalies chromosomiques, nucléaires et cellulaires, A) Distribution anormale des chromosomes après métaphase, B) Dégénérescence et agglutination chromosomique, C) Allongement des cellules et rétrécissement du noyau (X540)

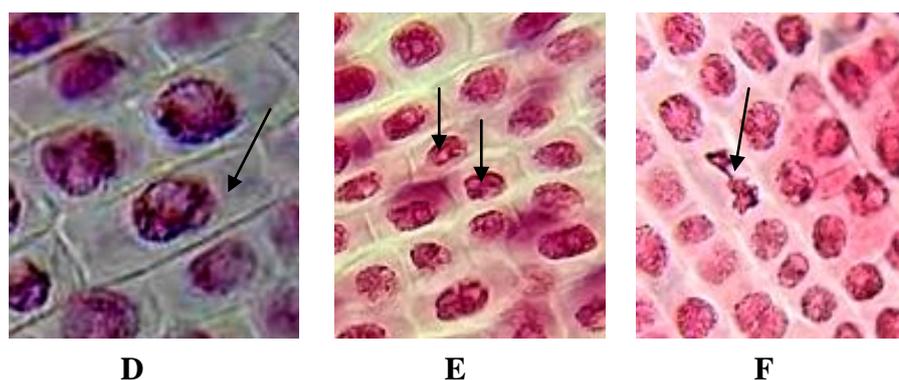


Fig.5. Anomalies chromosomiques, nucléaires et cellulaires, **D)** Cellule gigantesque avec large noyau, **E)** Agglutinations chromosomiques, **F)** Ponts et agglutinations chromosomiques (X540)

Les indices mitotiques retrouvés sont reportés dans le **Tableau I.**

Tableau I : Indices mitotiques des différents extraits testés.

<i>Extraits testés</i>	<i>IM (%) ± ES</i>
Témoin (-)	79.95 ± 2.64
<i>Aspergillus</i>	43.80 ± 1.76 C
<i>Penicillium</i>	42.50 ± 1.04 C
<i>Cladosporium+Aspergillus</i>	37.15 ± 1.74 BC
Colchicine	34.00 ± 1.07 AB
<i>Alternaria+Penicillium</i>	33.45 ± 1.03 AB
<i>Cladosporium</i>	32.30 ± 1.76 AB
<i>Alternaria</i>	32.15 ± 0.98 AB
<i>Aspergillus+Penicillium</i>	32.05 ± 0.80 AB
<i>Alternaria+Cladosporium</i>	30.85 ± 1.15 AB
<i>Alternaria+Aspergillus</i>	28.60 ± 1.09 A
<i>Cladosporium+Penicillium</i>	27.95 ± 0.86 A

IM : Indices mitotiques ; **ES :** Erreur Standard.

Des ANOVA réalisées entre le témoin non traité, la colchicine prise comme standard et les différents extraits fongiques montrent une différence hautement significative entre ces mesures ($p=0.00$). Ce qui confirme leur action dans l'inhibition de la mitose, produisant ainsi des anomalies chromosomiques et cellulaires. Les comparaisons multiples des moyennes ont révélé la formation de plusieurs groupes. Le groupe A est représenté par deux extraits fongiques dont l'effet antimittotique est le plus élevé, à savoir l'extrait de *Cladosporium+Penicillium* et *Alternaria+Aspergillus*. Par ailleurs, le groupe AB est

représenté par le standard : la colchicine, ainsi que les extraits fongiques suivants : *Alternaria*, *Cladosporium*, *Alternaria+Cladosporium*, *Aspergillus+Penicillium*, *Alternaria+Penicillium*. Ceci confirme leur action dans l'inhibition de la mitose au même titre que la colchicine. Pour ce qui est de l'extrait combiné *Cladosporium+Aspergillus*, il appartient au groupe BC. Le groupe C englobe les extraits possédant l'effet antimitotique le plus faible, il est représenté par les extraits fongiques de *Penicillium* et d'*Aspergillus* (**Tableau I**). Ces résultats indiquent que les extraits combinés *Cladosporium+Penicillium* et *Alternaria+Aspergillus* possèdent un effet antimitotique meilleur que celui de la colchicine utilisé comme standard, comparativement aux extraits fongiques de *Penicillium* et d'*Aspergillus* utilisés seuls, avec un effet antimitotique plus faible. Les extraits fongiques d'*Alternaria* et de *Cladosporium* avaient quant à eux un effet antimitotique similaire au standard sur les cellules méristématiques d'*Allium cepa*. Ce qui exprime les synergies entre ces champignons endophytes dans l'inhibition de la mitose.

Les essais antiprolifératifs sur *Saccharomyces cerevisiae* révèlent une inhibition de la croissance cellulaire pour les échantillons traités avec les extraits fongiques, ainsi que pour les échantillons traités avec les deux standards (colchicine et quercétine). Le phénomène de nécrose cellulaire a été observé au niveau des levures traitées par l'extrait d'*Alternaria* et l'extrait combiné *Alternaria+Penicillium* (Figure 6).

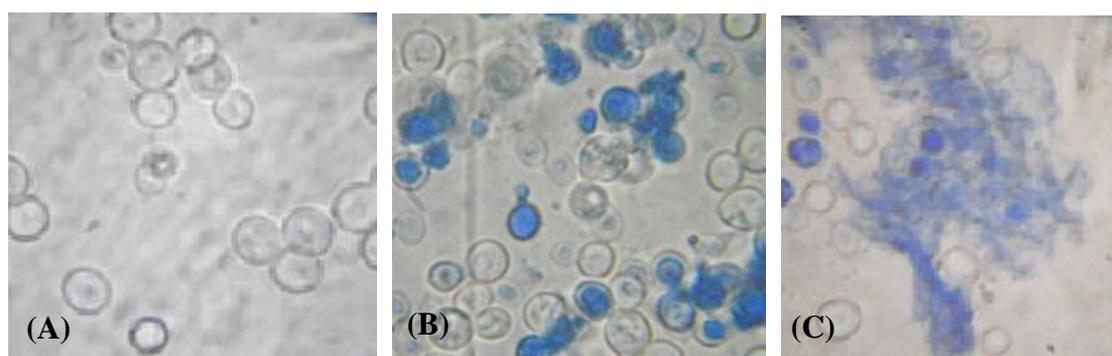


Fig.6. Action des extraits fongiques bruts de mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* sur *Saccharomyces cerevisiae* sous microscope optique (X3600).

A : contrôle (sans aucun extrait fongique). **B :** levure traitée avec l'extrait fongique (les cellules colorées sont des cellules mortes avec des débris cellulaires). **C :** début de nécrose cellulaire chez la levure traitée par l'extrait d'*Alternaria* et d'*Alternaria+Penicillium*.

Les pourcentages de cytotoxicité des extraits fongiques bruts testés sont donnés dans le **Tableau II**. Des ANOVA réalisées entre le témoin non traité, la colchicine et la quercétine prises comme standards, ainsi que les différents extraits fongiques testés montrent une différence hautement significative entre ces mesures ($p=0.00$). Ceci confirme leur action cytotoxique différente sur la prolifération cellulaire. Les comparaisons multiples des moyennes ont révélé la formation de différents groupes. L'extrait d'*Aspergillus* appartient au groupe A et l'extrait de *Cladosporium* au groupe AB. Le groupe BC regroupe respectivement les extraits combinés *Cladosporium+Penicillium* et *Aspergillus+Penicillium*. Le groupe BCD est représenté par la quercétine, qui est un flavonoïde à effet antiprolifératif. Quant au groupe BCDE, il est représenté par l'extrait fongique de *Penicillium*. L'extrait combiné *Alternaria+Aspergillus* appartient au groupe BCDEF. Le groupe CDEF est constitué de l'extrait fongique combiné *Aspergillus+Cladosporium*. Pour l'extrait d'*Alternaria*, il appartient au groupe DEF. Pour l'extrait combiné *Alternaria+Cladosporium*, il appartient quant à lui au groupe EF. Enfin, le groupe F est représenté par la colchicine et l'extrait fongique combiné *Alternaria+Penicillium*. Ces derniers représentent les indices les plus élevés, ce qui confirme leur cytotoxicité sur les cellules de levure, empêchant ainsi leur prolifération (**Tableau II**).

Tableau II : Pourcentages de cytotoxicité des extraits testés.

Extraits testés	PC(%) ± ES
<i>Alternaria+Penicillium</i>	57.33 ± 0.77 F
Colchicine	57.21 ± 1.25 F
<i>Alternaria+Cladosporium</i>	57.01 ± 1.17 EF
<i>Alternaria</i>	54.08 ± 0.90 DEF
<i>Aspergillus+Cladosporium</i>	51.63 ± 1.43 CDEF
<i>Alternaria+Aspergillus</i>	51.19 ± 1.09 BCDEF
<i>Penicillium</i>	49.64 ± 1.00 BCDE
Quercétine	48.16 ± 1.80 BCD
<i>Aspergillus+Penicillium</i>	46.44 ± 2.71 BC
<i>Cladosporium+Penicillium</i>	44.87 ± 1.59 BC
<i>Cladosporium</i>	43.75 ± 1.34 AB
<i>Aspergillus</i>	36.24 ± 0.92 A

PC : Pourcentages de cytotoxicité ; ES : Erreur standard.

Certains extraits fongiques des feuilles de *Peganum harmala* L. contiennent des composés à activité antiproliférative au même titre que la colchicine, qui est un alcaloïde. C'est le cas de l'extrait fongique combiné *Alternaria+Penicillium*. Ceci est dû à l'association synergique entre *Alternaria* et *Penicillium* : mycoendophytes de cette essence. Par ailleurs, les extraits fongiques de *Penicillium*, *Alternaria+Aspergillus*, *Aspergillus+Cladosporium*, *Alternaria* et *Alternaria+Cladosporium* montrent un effet antiprolifératif meilleur, comparé à la quercétine utilisé comme standard. Les extraits fongiques d'*Aspergillus* et de *Cladosporium* quant à eux, possèdent un effet cytotoxique moindre par rapport à ce flavonoïde qu'est la quercétine. En outre, ces derniers utilisés seuls avaient un effet cytotoxique moins important que la quercétine, mais une fois associé, l'extrait issu de la combinaison donne un effet cytotoxique meilleur par rapport au standard précédemment cité.

4. DISCUSSION

Les métabolites secondaires fongiques bruts des champignons endophytes de *Tabebuia argentea* : *Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium* ont un effet antimittotique et cytotoxique [27]. Il en est de même pour les extraits fongiques bruts des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* L. En effet, les souches d'*Alternaria* sont connues par leurs métabolites qui présentent une variété d'activités biologiques cytotoxiques et antimittotiques, qui ont attiré l'attention de nombreux chimistes, pharmacologues et phytopathologistes dans les programmes de recherche, ainsi que dans les études d'application [28, 29]. Par ailleurs, les combinaisons de nos extraits d'*Alternaria+Cladosporium*, d'*Aspergillus+Penicillium* et d'*Alternaria+Penicillium* avaient le même effet antimittotique que celui de la colchicine. Pour les extraits fongiques de *Cladosporium+Penicillium* et d'*Alternaria+Aspergillus*, ils présentent un effet antimittotique plus important. Ce qui signifie que ces mycoendophytes en association produisent des métabolites secondaires à activité antimittotique meilleure que celle de la colchicine. Les métabolites secondaires d'*Alternaria*, de *Cladosporium* et d'*Aspergillus* possèdent une activité similaire à celle d'un alcaloïde tel que la colchicine dans l'inhibition de la mitose. Un grand nombre d'agents anticancéreux naturels sont issus de champignons endophytes. Le taxol est un diterpénoïde qui agit contre les cellules tumorales, en améliorant l'assemblage des microtubules et en inhibant leur dépolymérisation. Il a été extrait à partir de

mycoendophytes de plantes : *Taxomyces andreanae* [30], *Pestalotiopsis microspora* [31], *Alternaria alternata*, *Periconia sp.*, *Pithomyces sp.*, *Chaetomella raphigera*, *Monochaetia sp.* et *Seimatoantlerium nepalense* [32].

Les genres de champignons endophytes : *Alternaria*, *Aspergillus* et *Cladosporium*, ont la capacité de produire du paclitaxel et ses analogues, tels que la baccatine III ou la 10-déacétylbaccatine III [33]. Le mode d'action du paclitaxel se liant à la tubuline- β spécifiquement, et empêche leur dépolymérisation au cours des processus de division cellulaire, ce qui fait de lui un agent efficace contre les cancers de la prostate, des ovaires, des seins et des poumons [34, 35].

L'extrait fongique d'*Aspergillus niger* : endophyte de *Tabebuia argentea*, contient du lapachol et a la même activité antimittotique que le taxol qui est un agent anticancer [27]. Sadananda et al. et Channabasava et Govindappa [36, 27] ont principalement rapporté que le lapachol est produit par des champignons endophytes, tels *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* et *Alternaria alternata*. Ils génèrent ainsi des modifications à différents niveaux du cycle cellulaire : cellules interphasiques rétrécies, distribution chromosomique anormale après métaphase, ponts chromosomiques modifiés à l'anaphase, adhérence chromosomique, agglutination en télophase, dégénérescence chromosomique, gros nucléole et des cellules gigantesques ont été observés. Ceci est en accord avec les résultats obtenus avec les extraits de *Cladosporium*, d'*Alternaria*, d'*Aspergillus* et *Penicillium* : mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* L.

Pour les essais antiprolifératifs, nos résultats indiquent une action cytotoxique sur *Saccharomyces cerevisiae*. Cette levure est l'organisme modèle pour mettre en lumière la mort cellulaire des cellules eucaryotes, identifier les altérations du cycle cellulaire en cours. Ceci est observé pour le lapachol isolé d'*Aspergillus niger* : endophyte isolé de *Tabebuia argentea* [27].

Dans notre étude, la plupart des cellules sont mortes et les débris cellulaires ont été observés en raison de la toxicité de l'extrait fongique d'*Alternaria*, ainsi que l'association de l'extrait d'*Alternaria* et de celui de *Penicillium*, similaire à la cytotoxicité de la colchicine confirmant ainsi l'effet toxique des extraits bruts de mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* L. Nous avons observé ainsi le phénomène de nécrose suite à cette toxicité. Des résultats

similaires ont été rapportés en utilisant des lignées de cellules cancéreuses à l'aide d'extraits de plantes [37, 38]. Le genre *Alternaria* est capable de produire le taxol à partir des taxanes, tel que rapporté par Caruso et al. [39]. Ces souches endophytiques sont productrices aussi d'alcaloïdes type vinblastine [40]. Récemment, les endophytes ont été reconnus comme sources importantes d'une variété de métabolites secondaires structurellement nouveaux et biologiquement actifs, y compris les terpènes, les stéroïdes, les alcaloïdes, et les dérivés des isocoumarines [41]. Les enzymes et les médicaments dérivés d'endophytes ont montré des applications dans la médecine, l'agriculture et l'industrie [42]. Un champignon endophyte *Alternaria sp.* isolé de *Sinopodophyllum hexandrum* est capable de produire la podophyllotoxine, qui a été utilisée comme un précurseur pour la synthèse chimique des médicaments anticancéreux qui agissent comme inhibiteurs de la topoisomérase [43, 44, 45].

5. CONCLUSION

En fonction des résultats ci-dessus, l'extrait du champignon endophyte s'est avéré contenir des composés biologiquement importants. En combinaison, ces composés bioactifs ont montré une activité antimitotique sur les cellules méristématiques des racines d'oignon et une activité antiproliférative pour les cellules de levure. D'autres études sont nécessaires pour identifier les composés de l'extrait fongique qui provoque une cytotoxicité qui peut être utilisé pour le traitement d'un cancer. Ce qui nous incite à exploiter cette voie, afin de trouver des molécules bioactives qui peuvent inhiber la prolifération des cellules tumorales. La caractérisation chimique est nécessaire pour identifier ces composés et leur mécanisme d'action. Si une source microbienne d'un médicament était disponible, il pourrait éliminer le besoin de récolter des plantes. Le prix du médicament devrait également être réduit, étant donné que ces molécules peuvent être produites par fermentation de la même manière que la pénicilline. Ainsi, la production de métabolites naturels par les mycoendophytes peut aider à protéger les ressources naturelles et à satisfaire les besoins en produits pharmaceutiques.

6. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] Zhang HW, Song YC and Tan RX. Biology and chemistry of endophytes. Nat Prod Rep., 2006, 23: 753–771.

- [2] Schulz B, Boyle C, Draeger S, Rommert AK and Krohn K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol Res.*, 2002, 106: 996–1004.
- [3] Kaul S, Gupta S, Ahmed M and K. Dhar M. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochem Rev.*, 2012, 11(4): 487–505.
- [4] Bourogaa E, Jarraya RM, Damak M and Elfeki A. Hepatoprotective activity of *Peganum harmala* against ethanol-induced liver damages in rats. *Arch Physiol Biochem.*, 2015, 121(2): 62-7.
- [5] Bukhari B, Choi JH, Jeon CW, Park HW, Kim WH, Khan MA and Leet SH. Phytochemical studies of the alkaloids from *Peganum harmala*. *Appl. Chem.*, 2008, 12: 101–104.
- [6] Jinous A and Fereshteh R. Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L. *Afr J Pharm Pharmacol.*, 2012, 6: 1573–1580.
- [7] Hilal SH, Haggag MY, Soliman F and El-Kashoury S. Alkaloids of *Peganum harmala* L. *Egypt Pharm Sci.*, 1978, 19: 393–399.
- [8] Boeira JM, Da Silva J, Erdtmann B, and Henriques JAP. Genotoxic Effects of the Alkaloids Harman and Harmine Assessed by Comet Assay and Chromosome Aberration Test in Mammalian Cells in vitro. *Pharmacology & Toxicology*, 2001, 89: 287.
- [9] Göckler N, Jofre G, Papadopoulos C, Soppa U, Tejedorand FJ and Becker W. Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. *FEBS Journal*, 2009, 276: 6324.
- [10] Adhami HR, Farsam H and Krenn L. Screening of Medicinal Plants from Iranian Traditional Medicine for Acetylcholinesterase Inhibition. *Phytotherapy Research*, 2011, 25: 1148.
- [11] Schulz B, Wanke S, Draeger S and Aust HJ. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycol. Res.*, 1993, 97: 1447-1450.
- [12] Ellis MB. *Dematiaceus hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 1971.
- [13] Watanabe T. *Soil and seed fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species*. CRC press, London, 2002.
- [14] Domsch KH, Gams W and Anderson TH. *Compendium of soil fungi*. IHW-Verlag,

Eching, 2007.

[15] Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC and Andersen B. Food and indoor fungi. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, 2010.

[16] Xiaoling C, Xiaoli L, Shining Z, Junping G, Shuiping W, Xiaoming L, Zhigang S and Yongcheng L. Cytotoxic and topoisomerase I inhibitory activities from extracts of endophytic fungi isolated from mangrove plants in Zhuhai, China. Journal of Ecology and The Natural Environment, 2010, 2: 017-024.

[17] Barik BP, Tayung K, Jagadev PN and Dutta SK. Phylogenetic placement of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Acorus calamus* rhizomes with antimicrobial activity. European Journal of Biological Sciences, 2010, 2: 8-16.

[18] Mohanta J, Tayung K and Mohapatra U. Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three Ethnomedicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India. The Internet Journal of Microbiology, 2008, 5(2):122-132.

[19] Madki MA, Manzoor AS, Powar PV and Patil K S. Isolation and Biological Activity of Endophytic Fungi from *Withania Somnifera*. International Journal of Pharmaceutical Sciences , 2010, 2: 848-858.

[20] Badji B, Riba A, Mathieu F, Lebrihi A and Sabaou N. Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. Journal de Mycologie Medicale, 2005, 4 (15): 211-219.

[21] Gogoi DK, Mazumder S, Saikia R and Bora TC. Impact of submerged culture conditions on growth and bioactive metabolite produced by endophyte *Hypocrea spp.* NSF-08 isolated from *Dillenia indica* Linn. in North-East India. Journal of Medical Mycology, 2008,1(18): 1–9.

[22] Qin JC, Zhang YM, Gao JM, Bai MS, Yang SX, Laatsch H and Zhang AL. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009, 6(19):1572-1574.

[23] Oliveira Silva MR, Sena Xisto K and Buarque Gusumao N. Secondary metabolites produced by endophytic fungus *Paecilomyces variotii* Bainier with antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*. In: Mendez-Vilas A.(eds). Current Research Topics in Applied Microbiology: Proceedings of the II international Conference on Environmental, Industrial and

Applied Microbiology (Biomicroworld2007), 2009, 519-520.

[24] Shweta S, Khadabadi S and Ganesh TG. *In vitro* antimetabolic, antiproliferative, DNA fragmentation and anticancer activity of chloroform and ethanol extract of *Revia hypocrariformis*. Asian Pacific J Trop Dis., 2012, S503-06.

[25] Subhadradevi V, Khairunissa K, Asokkumar K, Umamaheswari M, Sivashanmugam A and Jagannath P. Induction of apoptosis and cytotoxic activities of *Apium graveolens* Linn. using *in vitro* models. Middle-East J Sci Res., 2011, 9: 90-94.

[26] Sehgal R, Roy S and Kumar VL. Evaluation of cytotoxic potential of latex of *Calotropis procera* and *Podophyllotoxin* in *Allum cepa* root model. J Biocell., 2006, 30: 9-13.

[27] Channabasava and Govindappa M. First report of anticancer agent, lapachol producing endophyte, *Aspergillus niger* of *Tabebuia argentea* and its *in vitro* cytotoxicity assays. Bangladesh J Pharmacol., 2014, 9: 129-139.

[28] Brase S, Encinas A, Keck J and Nising CF. Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. Chem. Rev., 2009, 109: 3903–3990.

[29] Tsuge T, Harimoto Y, Akimitsu K, Ohtani K, Kodama M, Akagi Y, Egusa M, Yamamoto M and Otani H. Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. FEMS Microbiol. Rev., 2013, 37: 44–66.

[30] Stierle A, Strobel GA and Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. Science, 1993, 260: 214-16.

[31] Li JY, Stroble GA, Sidhu R, Hess WM and Ford EJ. Endophytic Taxol producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. Microbiology, 1996, 142: 2223-2226.

[32] Visalakchi S and Muthumary J. Taxol (anticancer drug) producing endophytic fungi: An overview. Int J Pharma Bio Sci. 2010, 1: 1-9.

[33] Zhao J, Shan T, Mou Y and Zhou L. Plant-Derived Bioactive Compounds Produced by Endophytic Fungi. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2011, 11: 159-168.

[34] Schiff PB, Fant J and Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. Nature, 1979, 277: 665-667.

[35] Wang LG, Liu XM, Kreis W and Budman DR. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. Cancer Chemother. Pharm., 1999, 44: 355-361.

- [36] Sadananda TS, Nirupama R, Chaithra K, Govindappa M, Chandrappa CP and Vinay Raghavendra B. Antimicrobial and antioxidant activities of endophytes from *Tabebuia argentea* and identification of anticancer agent (lapachol). J Med Plant Res., 2011,5: 3643-52.
- [37] Yu SF, Chen TM and Chen YH. Apoptosis and necrosis are involved in the toxicity of *Sauropus androgynus* in an *in vitro* study. J Formos Med Assoc., 2007, 106: 537-47.
- [38] Türk M, Kaya B, Menemen Y and Oğuztüzün S. Apoptotic and necrotic effects of plant extracts belonging to the genus *Alchemilla* L. species on HeLa cells *in vitro*. J Med Plants Res., 2011, 5: 4566-71.
- [39] Caruso M, Colombo AL, Fedeli L, Pavesi A, Quaroni S, Saracchi M and Ventrella G. Isolation of endophytic fungi and actinomycetes taxane producers. Ann. Microbiol., 2000, 50: 3–14.
- [40] Guo B, Li H and Zhang L. Isolation of a fungus producing vinblastine. J. Yunnan Univ. Nat. Sci., 1998, 20: 214–215.
- [41] Ya-Tuan M, Li-Rui Q, Wen-Quan S, An-Ling Z and Jin-Ming G. Metabolites produced by an endophyte *Alternaria alternata* isolated from *Maytenus hookeri*. Chem. Nat. Compd., 2010, 46 (3).
- [42] Zaferanloo B, Quang T D, Daumoo S, Ghorbani MM, Mahon PJ and Palombo EA. Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata* isolated from an Australian native plant. World J. Microbiol. Biotechnol., 2014, 30(6): 1755-1762.
- [43] Eyberger AL, Dondapati R and Porter JR. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. J. Nat. Prod., 2006, 69: 1121-1124.
- [44] Cao L, Huang J and Li J. Fermentation conditions of *Sinopodophyllum hexandrum* endophytic fungus on production of podophyllotoxin. Food Fermentation Ind., 2007, 33: 28-32.
- [45] Kour A, Shawl AS, Rehman S, Sultan P, Qazi PH, Suden P, Khajuria RK and Verma V. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. World J. Microbiol. Biotechnol., 2008, 24: 1115-1121.

How to cite this article:

Ouzid Y, Smail-Saadoun N, Houali K. Antimitotic and antiproliferative activities of crude fungal extracts of endophytic foliar fungi of *peganum harmala* l. from dayate aiat (laghouat, Algeria). J. Fundam. Appl. Sci., 2019, 11(2), 587-604.