



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA

RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Larbi Ben M'Hidi Oum El Bouaghi

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la vie

N ° d'ordre :

N ° de série :

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT 3ème cycle LMD

Filière : Sciences biotechnologiques

OPTION : Biotechnologie microbienne

Thème :

**Criblage du potentiel de biocontrôle de
différents isolats microbiens**

Présenté par

Mansouri Nedjwa

Devant le jury

Présidente du jury : M^r. ARHAB Rabah

Pr. Univ Larbi Ben M'hidi-OEB

Rapporteuse : M^{me}. BENSLAMA Ouided

M.C.A. Univ Larbi Ben M'hidi-OEB

Examinatrice : M^{me}. MERADI Laarem

Pr. Univ. Larbi Ben M'hidi-OEB

Examinatrice : M^{me}. GHORRI Sana

M.C.A. Univ frères Mentouri-Constantine

Examinatrice : M^{me}. BENSERRADJ Ouafa

M.C.A. Centre Universitaire-Mila

Année universitaire : 2022-2023

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

REMERCIEMENT

AVANT TOUTE CHOSE, *AL-HAMDU LILLAHI RABBIL 'ALAMIN* JE TIENS À LOUER **ALLAH** LE TOUT-UISSANT, LE TRÈS-GRACIEUX ET LE TRÈS-MISÉRICORDIEUX POUR LA BÉNÉDICTION QU'IL M'A ACCORDÉE PENDANT MES ÉTUDES ET POUR LA RÉALISATION DE CETTE THÈSE.

JE VOUDRAIS REMERCIER SINCÈREMENT MA PROMOTRICE, **DR. BENSLAMA OUIDED** MAITRE DE CONFÉRENCES À L'UNIVERSITÉ D'OUUM EL BOUAGHI, POUR SES CONSEILS, SA COMPRÉHENSION ET SA PATIENCE ET SURTOUT, ELLE M'A FOURNI DES ENCOURAGEMENTS POSITIFS ET UN ESPRIT CHALEUREUX POUR TERMINER CETTE THÈSE. CE FUT UN GRAND PLAISIR ET UN HONNEUR DE L'AVOIR COMME DIRECTRICE DE THÈSE.

JE TIENS ÉGALEMENT À EXPRIMER MA CHALEUREUSE GRATITUDE À **PR. ARHAB RABAH** PROFESSEUR À L'UNIVERSITÉ D'OUUM EL BOUAGHI POUR AVOIR ACCEPTÉ DE PRÉSIDER LE JURY.

JE TIENS À REMERCIER LES MEMBRES DU JURY ; **PR. MERADI LAAREM** PROFESSEUR À L'UNIVERSITÉ D'OUUM EL BOUAGHI, **DR. GHORRI SANA** MAITRE DE CONFÉRENCES À L'UNIVERSITÉ DE CONSTANTINE, ET **DR. BENSERRADJ OUAFÀ** MAITRE DE CONFÉRENCES AU CENTRE UNIVERSITAIRE MILA, POUR AVOIR CONSACRÉ LEUR TEMPS ET ACCEPTÉ DE LIRE ET D'ÉVALUER CE MODESTE TRAVAIL.

MERCI À **MR. BELHOUCHE ALI** INGÉNIEUR AU LABORATOIRE DE L'UNIVERSITÉ D'OUUM EL BOUAGHI POUR SON AIDE ET SES CONSEILS.

MERCI À L'ENSEMBLE DES PERSONNES QUI ONT CONTRIBUÉ DE PRÈS OU DE LOIN À MA THÈSE

DÉDICACE

C'EST AVEC UNE RÉELLE RECONNAISSANCE ET UNE AFFECTION SINCÈRE QUE JE DÉDIE CE TRAVAIL À MA FAMILLE, MES AMIS ET MES PROFESSEURS.

À MA MÈRE ADORÉE, SANS TOI JE N'AURAIS PAS ATTEINT CE NIVEAU. TES BEAUX MOTS ET TA CONSTANTE TENDRESSE QUI M'ONT ACCOMPAGNÉ TOUT AU LONG DE MA VIE CE QUI M'A DONNÉ L'ENTHOUSIASME ET LA FORCE D'ARRIVER ICI.

À MON CHER PÈRE, TON SOUTIEN ET TA TENDRESSE ONT TOUJOURS ÉTÉ AU CŒUR DE MES PENSÉES. SAVOIR QUE MON SUCCÈS EST CE QUI TE RÉJOUIT LE PLUS EST UN PLAISIR DONT JE TE SERAI TOUJOURS RECONNAISSANTE.

À MES SŒURS NAWEL, SIHEM ET HINDA POUR LEURS ENCOURAGEMENTS ET LEUR SOUTIEN.

À MON CHER FRÈRE YACINE AINSI QU'À SA FAMILLE ET SES ENFANTS BESMALA, ZAKARIYA ET NOUR EL YAKINE.

À MES AMIS, CEUX AVEC QUI J'AI PASSÉ LES PLUS BELLES ANNÉES DE MA VIE. VOTRE AMITIÉ EST UNE CHANCE QUE JE CHÉRIRAI POUR L'ÉTERNITÉ.

ET ENFIN À VOUS, CHER LECTEUR.

NEDJWA

TABLE DES MATIERES

Liste d'abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction01

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Contrôle biologique (biocontrôle)

1. Définition de biocontrôle.....	08
2. Mécanisme de lutte biologique.....	09
2.1.Interaction directe.....	10
2.1.1. Parasitisme	10
2.1.2. Antibiose.....	11
2.1.2.1.Les antibiotiques.....	11
2.1.2.2.Les bactériocines	12
2.1.2.3.Les enzymes	12
2.1.2.4.Les composés volatiles.....	13
2.1.3. Compétition	13
2.1.3.1.Production de sidérophores	14
2.1.3.2.Quorum sensing	14
2.2.Interaction indirecte	14
2.2.1. Résistance systémique induite	15
2.2.2. Hormones végétales	15
3. Les microorganismes utilisés en biocontrôle	15
3.1.Les bactéries	15
3.1.1. <i>Bacillus</i>	16
3.1.1.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	16
3.1.1.2. <i>Bacillus subtilis</i>	17
3.1.1.3. <i>Bacillus pumilus</i>	17
3.1.1.4. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	17
3.1.1.5. <i>Bacillus firmus</i>	18
3.1.1.6. <i>Bacillus licheniformis</i>	18
3.1.1.7. <i>Bacillus megaterium</i>	18
3.1.1.8. <i>Bacillus mycoides</i>	19

3.1.2. <i>Pseudomonas</i>	19
3.1.2.1. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	20
3.1.2.2. <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	20
3.1.2.3. <i>Pseudomonas putida</i>	20
3.1.3. <i>Rhizobacterium</i>	20
3.1.4. <i>Agrobacterium</i>	21
3.1.5. <i>Enterobacter</i>	21
3.1.6. <i>Serratia</i>	22
3.1.7. <i>Azospirillum</i>	22
3.1.8. Les Actinomycètes	23
3.1.8.1. <i>Streptomyces</i>	24
3.1.8.2. Actinomycète non- <i>Streptomyces</i>	26
3.2. Les champignons	26
3.2.1. <i>Trichoderma</i>	27
3.2.2. <i>Beauveria</i>	27
3.2.3. <i>Fusarium</i>	27
3.2.4. Autres champignons	28

Chapitre 2 : Actinomycète et Champignons filamenteux

I. Les actinomycètes

1. Généralités	29
2. Morphologie des actinomycètes	29
2.1. Mycélium de substrat	30
2.2. Mycélium aérien	30
2.3. Morphologie de la chaîne des spores	30
3. Cycle de vie	32
4. Classification des actinomycètes	33
5. Distribution des actinomycètes	35
5.1. Le sol	35
5.2. Habitat aquatique	35
5.3. Habitats extrêmes	36
5.4. L'air	36
5.5. Insectes et oiseaux	37
6. Importance des actinomycètes	37
6.1. Production des antibiotiques	37

6.2.	Production des enzymes	37
6.3.	Production des molécules de contrôles des ravageurs de plantes	39
II. Les champignons		
1.	Généralité sur les champignons	40
2.	Morphologie des champignons filamenteux	40
2.1.	Spore fongique	42
2.1.1.	Spores asexuelles	42
2.1.2.	Spores sexuelles	43
3.	Classification des champignons	43
3.1.	Ascomycota	44
3.1.1.	Taphrinomycotina	45
3.1.2.	Saccharomycotina	45
3.1.3.	Pezizomycotina	45
3.2.	Basidiomycota	46
3.2.1.	Chytridiomycota	46
3.2.2.	Glomeromycota	47
3.2.3.	Blastocladiomycota	48
3.2.4.	Neocallimastigomycota	48
3.2.5.	Microsporidies	49
4.	Distribution des moisissures dans la nature	49
4.1.	L'air	49
4.2.	Le sol	50
4.3.	L'eau	50
5.	Avantages des moisissures	51
6.	Champignons phytopathogènes	52
6.1.	Facteurs de virulence des champignons phytopathogènes	52
6.1.1.	Enzymes dégradant la paroi cellulaire	52
6.1.2.	Toxines	53
6.1.3.	Régulateurs de croissance	54
6.1.4.	Protéines effectrices	54
6.1.5.	Lipides	55
7.	Le genre <i>Alternaria</i>	55
7.1.	Historique	55
7.2.	Taxonomie et classification d' <i>Alternaria</i>	57

7.3. Morphologie d' <i>Alternaria</i>	58
7.4. Cycle de vie des espèces phytopathogènes d' <i>Alternaria</i>	60
7.5. Biologie d' <i>Alternaria</i>	60
7.6. Pathogénicité d' <i>Alternaria</i>	61
7.6.1. Production des enzymes	62
7.6.1.1. Cystathionine béta lyase (CBL)	62
7.6.1.2. Glutathione reductase	63
7.6.1.3. Homoserine O-acétyl transférase	63
7.6.1.4. Pecate lyase	64
7.6.1.5. Thioredoxine peroxidase et thioredoxine réductase	65
7.6.2. Production des toxines	65
7.6.2.1. Toxines non spécifiques à l'hôte	66
7.6.2.2. Toxines spécifiques à l'hôte	66
7.6.3. Production de mélanine	66
7.7. Effet négatives d' <i>Alternaria</i> sur la santé	68

Chapitre 3 : Approches d'analyse computationnelle

1. Docking moléculaire	69
1.1. Définition	69
1.2. Algorithmes du docking moléculaire	70
1.3. Fonction de notation (scoring)	71
1.3.1. Les fonctions basées sur le champ de force	73
1.3.2. Les fonctions basées sur la connaissance	74
1.3.3. Les fonctions empiriques	74
1.4. Types de liaisons entre le récepteur et le ligand	75
1.5. Etape du docking moléculaire	76
2. Modélisation moléculaire.....	79
2.1. Généralités sur la structure des protéines	79
2.2. Méthodes in silico de la modélisation d'une structure protéique	81
2.2.1. Méthode ab initio	82
2.2.2. Modélisation comparative	83
2.2.3. Méthode d'enfilage	83
2.3. Etapes de la modélisation comparative	84

2.3.1. Identification du template (matrice)	84
2.3.2. Alignements de séquences	84
2.3.3. Construction d'un modèle pour la cible sur la base de la structure 3D de la matrice	85
2.3.4. Affinement du modèle, analyse des alignements, suppressions et ajouts de lacunes	85
2.3.5. Validation du model	86
3. Simulations de la dynamique moléculaire (SDM)	87

Matériel et méthodes

Partie 1. Criblage in vitro de l'activité antifongique contre le phytopathogène *Alternaria* sp.

1. Echantillonnage de sol d'étude	91
2. Isolement des microorganismes antagonistes	91
3. Isolement des champignons phytopathogènes	91
4. Criblage in vitro de l'activité antifongique	92
5. Caractérisation des isolats antagonistes sélectionnés	93
5.1. Caractérisation macroscopique	93
5.2. Caractérisation microscopique	94
5.3. Caractérisation de l'activité enzymatique	94
5.3.1. Activité protéolytique	94
5.3.2. Activité cellulolytique	94
5.3.3. Activité amylasique	95
5.3.4. Activité pectinolytique	95
5.3.5. Activité lipolytique et estérolytique	95
5.3.6. Activité chitinolytique	95
5.3.7. Activité laccase	96
6. Criblage de l'activité antifongique des molécules bioactives secrétées par les antagonistes fongiques et actinomycétales	96
7. Analyse statistique	97

Partie 2. Criblage in planta de l'activité antifongique des souches antagonistes contre le phytopathogène *Alternaria* sp.

Partie 3 : Criblage in silico de l'activité antifongique

1. Prédiction des structures 3D des enzymes cibles par la modélisation homologue	98
1.1.Préparation des séquences cibles	98
1.2.Identification et sélection des séquences protéiques templates	100
1.3.Modélisation des protéines cibles	101
1.4.Evaluation des modèles	101
2. Prédiction des sites actives des protéines modèles	101
3. Etudes des interactions par Docking moléculaire	101
3.1.Préparation des récepteurs cibles	101
3.2.Préparation des ligands	102
3.3.Docking moléculaire	102
3.4.Visualisation des interactions moléculaires	103
4. Etude des propriétés ADMET et ressemblance médicamenteuse (Drug Likeness) ...	104
5. Simulation de la dynamique moléculaire	104
5.1.Initialisation : fichiers structure/topologie/champ de force	105
5.2.Minimisation de l'énergie	105
5.3.Chauffage du système de la simulation	105
5.4.Équilibrage à température constante	106
5.5.Phase de production de la trajectoire MD	106

Résultats et discussion

Partie 1. Criblage in vitro de l'activité antifongique contre le phytopathogène <i>Alternaria</i> sp.	108
1. Isolement des microorganismes antagonistes	109
2. Isolement des champignons phytopathogènes	111
3. Criblage in vitro de l'activité antagoniste	113
4. Caractérisation des isolats antagonistes sélectionnées	117
4.1. Caractérisation macroscopique	117
4.2. Caractérisation microscopique	123
4.3. Caractérisation de l'activité enzymatique	127
4.3.1. Activité protéolytique	127
4.3.2. Activité cellulolytique	130
4.3.3. Activité amylolytique	132
4.3.4. Activité pectolytique	135
4.3.5. Activité lipolytique et estérolitique	138

4.3.6. Activité chitinolytique	141
4.3.7. Activité laccase	144
5. Détermination <i>in vitro</i> de l'activité inhibitrice des molécules bioactives secrétées par les souches antagonistes	146
Partie 2. Criblage <i>in planta</i> de l'activité antifongique des souches antagonistes contre le phytopathogène <i>Alternaria</i> sp.	155
Partie 3. Criblage <i>in silico</i> du potentiel de biocontrôle de métabolites secondaires fongiques et actinomycétales	159
1. Modélisation homologue des cibles enzymatiques	159
1.1. Identification et sélection des templates (matrices) des enzymes cibles	159
1.2. Modélisation homologues des enzymes cibles	161
2. Evaluation des modèles protéiques	162
3. Prédiction de site active de protéine modèle	175
4. Docking moléculaire	180
5. Visualisation des interactions des complexes prometteurs récepteur- ligand	187
6. Etude pharmacocinétique et ADMET	230
6.1. Analyse des propriétés ADME (Drug Likeness)	233
6.2. Analyse des propriétés toxicologiques des ligands	239
7. Simulation dynamique moléculaire	244
7.1. Ecart quadratique moyen (RMSD)	244
7.2. Fluctuations quadratiques moyennes (RMSF)	245
7.3. Rayon de giration (Rg)	245
7.4. Surface accessible aux solvants (SASA)	246
7.5. Liaison hydrogènes	246
Conclusion et perspectives	249
Références bibliographiques	256
Annexes	
Travaux scientifiques	
Résumé	

Liste des figures

- Figure 1.** Mécanismes d'actions mis en œuvre par les agents de lutte biologique pour la gestion des maladies des plantes.
- Figure 2.** Résumé des principaux mécanismes de lutte biologique par *Streptomyces* contre les maladies des plantes.
- Figure 3.** Morphologie des spores chez les actinomycètes.
- Figure 4.** Cycle de vie des actinomycètes.
- Figure 5.** Systématique des actinomycètes.
- Figure 6.** Structure et morphologie de moisissure.
- Figure 7.** Formation d'un culot fongique à partir d'une spore.
- Figure 8.** Phylogénie et classification des champignons.
- Figure 9.** La reproduction chez les *Chytridiomycètes*.
- Figure 10.** Morphologie d'*Alternaria*.
- Figure 11.** Morphologie des conidies.
- Figure 12.** Cycle évolutif d'*Alternaria* sp.
- Figure 13.** La voie de biosynthèse mélanine -DHN.
- Figure 14.** Types de docking moléculaire.
- Figure 15.** Structure primaire des protéines.
- Figure 16.** Structure secondaire des protéines.
- Figure 17.** Les trois types des angles de torsion.
- Figure 18.** Photo de tomate présentant des symptômes d'alternariose.
- Figure 19.** Schéma représentant la technique de la confrontation directe.
- Figure 20.** Stratégie de la simulation de la dynamique moléculaire.
- Figure 21.** Histogramme représentant le nombre d'isolats de champignons et d'actinomycètes selon le type de sol.
- Figure 22.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Tom 1 d'*Alternaria* sp.
- Figure 23.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Tom 2 d'*Alternaria* sp.
- Figure 24.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Tom 3 d'*Alternaria* sp.
- Figure 25.** Résultat de la confrontation directe des 10 meilleures souches.
- Figure 26.** Quelques résultats de la confrontation directe montrant des effets antagonistes.
- Figure 27.** Caractérisation macroscopique de souche antagoniste actinomycétale Act11 sur différents milieux de culture.
- Figure 28.** Résultat de l'activité protéolytique des meilleures souches antagonistes.
- Figure 29.** Résultat de l'activité cellulolytique des meilleures souches antagonistes.
- Figure 30.** Résultat de l'activité amylolytique des meilleures souches antagonistes.
- Figure 31.** Résultat de l'activité pectinase des souches sélectionnées.
- Figure 32.** Résultats de l'activité estérolitique des souches sélectionnées.
- Figure 33.** Résultats de l'activité lipolytique des meilleures souches antagonistes.
- Figure 34.** Résultats de l'activité enzymatique chitinolytique des meilleures souches antagonistes.
- Figure 35.** Résultat de test de l'activité enzymatique laccase des meilleures souches antagonistes.
- Figure 36.** Effet du filtrat de l'antagoniste Fun3 contre le phytopathogène Tom2.

Figure 37. Effet du filtrat de l'antagoniste Fun3 contre le phytopathogène Tom3.

Figure 38. Effet du filtrat de l'antagoniste Fun18 contre le phytopathogène Tom1.

Figure 39. Effet du filtrat de l'antagoniste Fun18 contre le phytopathogène Tom3.

Figure 40. Effet du filtrat de l'antagoniste Fun42 contre le phytopathogène Tom1.

Figure 41. Effet du filtrat de l'antagoniste Fun42 contre le phytopathogène Tom2.

Figure 42. Effet du filtrat de l'antagoniste Fun13 contre le phytopathogène Tom3.

Figure 43. Résultats de l'effet *in planta* des filtrats des antagonistes sur les tomates infectées par *Alternaria*.

Figure 44. Résultat de l'analyse de PROCHECK des enzymes modèles.

Figure 45. Résultat de l'analyse Verify 3D des enzymes modèles.

Figure 46. Résultat de l'analyse ERRAT des enzymes modèles.

Figure 47. Résultat de l'analyse ProSA et Z-score des enzymes modèles.

Figure 48. Résultat de l'analyse QMEAN DisCo des enzymes modèles.

Figure 49 : résultat de l'analyse de sites actifs des enzymes modèles par le serveur CastP, Pymol et Discovery Studio.

Figure 50. Illustration 2D et 3D des interactions entre la cystathionine beta lyase et ses meilleurs ligands.

Figure 51. Illustrations 2D et 3D des interactions entre la glutathione réductase et ses meilleurs ligands.

Figure 52. Illustrations 2D et 3D des interactions entre la pecate lyase et ses meilleurs ligands.

Figure 53. Illustrations 2D et 3D des interactions entre la Scytalone déshydratase et ses meilleurs ligands.

Figure 54. Illustrations 2D et 3D des interactions entre la thioredoxin réductase et ses meilleurs ligands.

Figure 55. Illustrations 2D et 3D des interactions entre la thioredoxin peroxidase et ses meilleurs ligands.

Figure 56. Illustrations 2D et 3D des interactions entre la 3HNR et ses meilleurs ligands.

Figure 57. Illustrations 2D et 3D des interactions entre la 4HNR et ses meilleurs ligands.

Figure 58. Résultat de simulation MD à 50 ns.

Liste des tableaux

- Tableau 1.** Liste des produits à base de *Streptomyces* spp. disponibles sur le marché mondial.
- Tableau 2.** Différents types de produits fongiques filamenteux d'importance industrielle.
- Tableau 3.** Les programmes de docking moléculaire les plus utilisés.
- Tableau 4.** Les différents types de champ de force.
- Tableau 5.** Dimensions de la boîte de grille du site actif des enzymes cibles modélisées.
- Tableau 6.** Les ligands de références utilisés pour les enzymes cibles modélisées.
- Tableau 7.** Résultat de pourcentage d'inhibition de la croissance radiale (PIRG) des 10 meilleures souches.
- Tableau 8.** Les caractères cultureux des souches antagonistes fongiques sélectionnées sur le milieu PDA.
- Tableau 9.** Les caractères cultureux des souches meilleures fongiques antagonistes sur le milieu Sabouraud.
- Tableau 10.** Résultat de caractérisation macroscopique de la souche antagoniste actinomycétale Act11.
- Tableau 11.** Résultat de l'observation microscopiques des meilleures souches antagonistes fongiques.
- Tableau 12.** Résultat de l'observation microscopiques de la meilleure souche antagoniste actinomycétale.
- Tableau 13.** Résultat de l'activité protéolytique des meilleures souches antagonistes.
- Tableau 14.** Résultat de l'activité cellulolytique des meilleures souches antagonistes.
- Tableau 15.** Résultat de l'activité amylolytique des meilleures souches antagonistes.
- Tableau 16.** Résultats de l'activité pectinase des meilleures souches antagonistes.
- Tableau 17.** Résultats de l'activité estérolitique des meilleures souches antagonistes souches.
- Tableau 18.** Résultats de l'activité lipolytique des meilleures souches antagonistes.
- Tableau 19.** Résultats de l'effet des filtrats de fermentation des souches antagonistes sur la croissance des souches phytopathogènes par différentes concentrations.
- Tableau 20.** L'analyse statistique de l'effet de concentration de filtrat sur la suppression de Tom1.
- Tableau 21.** L'analyse statistique de l'effet de concentration de filtrat sur la suppression de Tom2.
- Tableau 22.** L'analyse statistique de l'effet de concentration de filtrat sur la suppression de Tom3.
- Tableau 23.** Résultats de l'activité antifongique des filtrats des antagonistes *in planta*.
- Tableau 24.** Séquences templates choisies pour la modélisation des structures 3D des enzymes cibles d'*Alternaria* sp.
- Tableau 25.** Résultats de score DOPE des meilleurs modèles.
- Tableau 26.** Résultat des valeurs RMSD des protéines modélisées.
- Tableau 27.** Résultat des scores de la qualité des modèles étudiés par les différents programmes d'évaluation.
- Tableau 28.** Résultat de résidus catalytiques des sites actifs des enzymes modèles et templates.

Tableau 29. Résultat de docking moléculaire donnés en scores d'affinité entre les enzymes modélisées et les ligands fongiques.

Tableau 30. Résultat de docking moléculaire donnés en scores d'affinité entre les enzymes modélisées et les ligands actinomycétales.

Tableau 31. Types d'interactions entre le récepteur cystathionine beta lyase et les meilleurs ligands fongiques et actinomycétales.

Tableau 32. Différents types d'interactions entre le récepteur glutathione réductase et les ligands fongiques et actinomycétales.

Tableau 33. Différents types d'interactions entre le récepteur pecate lyase et les ligands fongiques et actinomycétales.

Tableau 34. Types d'interactions entre le récepteur scytalone déhydratase et les meilleurs ligands fongiques et actinomycétales.

Tableau 35. Types d'interactions entre le récepteur thioredoxin réductase et les meilleurs ligands fongiques et actinomycétales.

Tableau 36. Différents types d'interactions entre le récepteur thioredoxin peroxidase et les meilleurs ligands fongiques et actinomycétales.

Tableau 37. Types d'interactions entre le récepteur 3HNR et les meilleurs ligands fongiques et actinomycétales.

Tableau 38. Types d'interactions entre le récepteur 4HNR et les meilleurs ligands fongiques et actinomycétales.

Tableau 39. Résultat de l'étude pharmacocinétique des ligands biofongicides potentiels.

Tableau 40. Résultat de l'étude ADME des métabolites fongiques et actinomycétales sélectionnés.

Tableau 41. Suite de résultat de l'étude de l'étude ADMET des composés sélectionnés.

Tableau 42. Les valeurs moyennes de RMSD, RMSF, Rg, SASA et nombre de liaisons H pour les complexes étudiés.

Liste des abréviations

ABC : Agent de biocontrôle.

3HNR : 1,3,8-trihydroxynaphthalene réductase.

4HNR : 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene réductase.

ADMET : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion, Toxicité.

AMES : Test de mutagénicité.

AMR : Atom Molar Refractivity.

AR : Récepteur Androgénique.

BBB: Blood Brain Barrier.

Blast: Basic Local Alignment Search Tool.

Caco-2 : Human colorectal adenocarcinoma cells.

CASTp : Atlas informatisé de la topographie de surface de protéines.

Cl : Clairance.

CMC : Carboxyméthylcellulose.

Cyp : Cytochrome P450.

DMP : Dimethoxyphénol.

Dope : Discrete Optimized Protein Energy.

ER : Récepteur Estrogénique.

HBA: Hydrogen Bond Acceptors.

HBD: Hydrogen Bond Acceptor.

hERG: Human Ether-à-go-go-Related Gene.

H-HT: Human Hepatotoxicity.

HIA: Human intestinal absorption.

ISP : International *Streptomyces* project.

LD₅₀: Dose Létale Médiane.

Log P : Coefficient de partage d'une molécule.

LogS : Coefficient de solubilité.

NCBI : National Center for Biotechnology Information.

nRB: Number of rotatable bonds.

Ns: nano-seconde.

PDA: Potato Dextrose Agar.

PDB: Protein Data Bank.

Pgp: P-Glycoprotein.

PGPM: Plant Growth Promoting Microorganism.

PIRG : Pourcentage d'inhibition de la croissance radiale.

PPB : Plasma Protein Binding.

Rg : Rayon de giration.

RMSD: Root Mean Square Deviation.

RMSF: Stands for root mean square fluctuation.

SASA : Solvent Accessible Surface Area.

SDM : Simulation Dynamique Moléculaire.

TPSA : Total Polar Surface Area.

Introduction

« Le secret d'un bon discours, c'est d'avoir
une bonne introduction »

De *George Burns*

La tomate (*Solanum lycopersicum*) appartient à la famille des solanacées, qui comprennent plus de 3000 espèces. C'est l'espèce végétale la plus répandue dans le monde, principalement cultivée en Asie, en Afrique, aux États-Unis et en Europe (**Sellitto et al., 2019**). La tomate est une source riche de vitamines A et C, de minéraux (fer, phosphore), de lycopène, de bêta-carotène, d'une grande quantité d'eau et de faible teneur en calories (**Melomey et al., 2019**). De manière générale, la tomate occupe une place importante dans l'alimentation humaine ; où elle est consommée fraîche, séchée, en pâte, en purée, en jus, en sauce ou en poudre de tomate.

La tomate est l'une des plus importantes cultures maraîchères de l'Algérie. Sa production annuelle passe de 107 millions de tonnes en 2014 à 148 millions de tonnes en 2019, cultivée dans diverses régions du pays, notamment les wilayas de Tlemcen, Mostaganem, Ain-Defla, Chlef, Tipaza, Jijel, Skikda, Guelma, Annaba, Adrar et Biskra (**Benali et Ramdani, 2021**). Concernant la production globale de la tomate industrielle, elle a atteint 15,4 millions de quintaux en 2018, tandis que la superficie plantée a augmenté à 23,702 hectares, ce qui correspond à une hausse de 17% par rapport à l'année 2017 (**Presse nationale en ligne : Site web 1 ; consulté le 14/10/2022**).

L'aptitude de production du concentré de tomate en Algérie est de 160 000 tonnes par an. Pas moins de 12 millions de quintaux de ce produit agricole ont été réalisés en 2017, dont 80 % de la production est assurée par les Wilayas d'El Tarf, Annaba, Guelma et de Skikda (**Presse nationale en ligne : site web 2, consulté le 14/10/2022**). L'année 2018 a été marquée par l'introduction de la culture de tomate industrielle au niveau de trois autres Wilaya : Constantine (20 ha), Tamanrasset (14 ha à In Salah) et Nâama (59 ha) (**Presse nationale : Site web 1, consulté le 14/10/2022**). Diverses maladies fongiques telles que l'antracnose, brûlure alternarienne, fusariose, oïdium, pourriture des fruits et des racines de Buckeye, fonte des semis, des maladies bactériennes telles que la chancre bactérien, moucheture bactérienne, et des maladies virales qui comprennent le virus des feuilles jaunes en cuillère et la mosaïque de tomate affectent la production de la tomate et diminuent sa valeur économique en détériorant sa qualité (**Garg et al., 2020**).

La maladie de la brûlure alternarienne de la tomate causée par les espèces d'*Alternaria* est l'une des maladies les plus importantes causant des pertes importantes et réduisant à la fois la qualité et la quantité de la tomate, détériorant ainsi ses valeurs nutritives et causant d'importantes pertes économique (**Meena et al., 2016**).

L'alternariose est causée par le pathogène du sol *Alternaria*, ce pathogène a diverses espèces qui attaquent différentes plantes hôtes, à savoir *Alternaria solani* (causant l'alternariose chez la pomme de terre et la tomate), *Alternaria cucumerina* (causant des taches foliaires chez les cucurbitacées et la tomate), *Alternaria brassicae* (causant la fonte des semis du chou et du brocoli), *Alternaria citri* (provoque la pourriture noire des agrumes), *Alternaria japonica* (causant la maladie des points noirs chez les crucifères), *Alternaria alternata* (provoquant la tâche des fruits chez les poivrons et chez la tomate), *Alternaria burnsii* (causant la brûlure des fleurs de cumin), *Alternaria radicina* (causant la pourriture noire de la carotte), *Alternaria triticina* (causant la brûlure des feuilles du blé) (Tomer et Diwivedi, 2020).

Divers fongicides systémiques ont été utilisés pour lutter contre l'alternariose. Cependant, les produits chimiques sont chers et augmentent le coût de production de 20% (Mugao *et al.*, 2020). De plus, les fongicides chimiques ont de nombreux effets néfastes. Ils polluent l'environnement en contaminant le sol, les plans d'eau et les aliments, causant par la suite des dommages aux êtres vivants, y compris les humains et les organismes bénéfiques non ciblés tels que les microorganismes (Stangarlin *et al.*, 2011). Certains des ingrédients actifs des produits agrochimiques sont des perturbateurs hormonaux et peuvent provoquer l'infertilité, le cancer et des mutations qui entraînent la résistance des agents pathogènes aux produits chimiques (Mugao *et al.*, 2020).

Face à ces enjeux, trouver des alternatives naturelles et respectueuses de l'environnement devient une nécessité croissante. La lutte biologique (ou biocontrôle) est une stratégie importante et respectueuse de l'environnement, appliquée pour la gestion des maladies infectieuses des plantes causées par différents types de ravageurs incluent des insectes nuisibles, des microorganismes pathogènes des cultures, des mauvaises herbes et des rongeurs (Stenberg *et al.*, 2021). Elle est basée sur l'utilisation des organismes vivants et/ou leurs produits naturels pour inhiber la croissance des agents pathogènes et améliorer l'immunité des plantes (He *et al.*, 2021). Les agents de lutte biologique microbiens peuvent fournir une alternative écologique aux fongicides chimiques (Yazici *et al.*, 2011). Les microorganismes sont omniprésents dans l'environnement, possèdent un degré élevé de spécificité d'hôte. De plus, les microorganismes sont faciles à cultiver et à entretenir en laboratoire et ils ne nuisent pas à l'environnement (Chaurasia *et al.*, 2018 ; Sharma, 2019). Ces agents de lutte biologique jouent un rôle important, où ils ont été utilisés pour inhiber plusieurs agents pathogènes de plantes en utilisant divers mécanismes tels que l'hyperparasitisme et la

production de divers types de molécules antimicrobiennes et d'enzymes efficaces ainsi que la concurrence pour les nutriments et l'espace (**Lahuf *et al.*, 2019**). L'utilisation de microorganismes antifongiques (bactéries, levures et champignons filamenteux) possédant une activité antagoniste vis-à-vis des phytopathogènes est donc devenue un domaine de recherche émergent (**Millan *et al.*, 2021**).

Les métabolites secondaires produits par les microorganismes peuvent nuire à la croissance ou aux activités métaboliques d'autres microorganismes pathogènes. Ils sont produits et secrétés dans l'environnement en petites quantités par de nombreux espèces. Un grand nombre de ces molécules connus sont produits par les actinomycètes (environ 8700) et les champignons (environ 4900) (**Berdy, 2005**). Ces molécules bioactives représentent alors des candidats potentiels pour remplacer les produits phytosanitaires chimiques à des fins de lutte biologique contre les ravageurs.

Les champignons microscopiques appelées aussi les moisissures sont des microorganismes eucaryotes, filamenteux, pluricellulaires, ubiquitaire dans l'environnement, connus par la capacité de production d'une grande variation des molécules bioactives ayant des propriétés sanitaires, pharmaceutiques, alimentaires et industrielles (**Satyanarayana *et al.*, 2019**). L'utilisation des moisissures dans le domaine de la lutte biologique offre un avantage à cause de la relation symbiotique entre les champignons et les plantes hôtes. Ils peuvent stimuler la croissance de plante hôte en agissant comme des agents de biocontrôle, soit par antagonisme direct contre le phytopathogènes ou en induisant une résistance systémique chez les plantes contre le phytopathogène en produisant des différents types d'enzymes et des molécules antimicrobiennes (**Gholami *et al.*, 2019 ; Poveda et Baptista, 2021**).

En plus des champignons, les actinomycètes est un autre groupe de microorganisme connu pour sa richesse métabolique. Ce sont des bactéries à Gram positive, riche en guanine-cytosine (GC), largement distribués dans l'environnement (**Undabarrena *et al.*, 2021**). Les actinomycètes constituent un groupe important de microorganismes, en tant que dégradeurs de matière organique dans l'environnement naturel, producteurs d'antibiotiques, enzymes et d'autres composés utiles pour les organismes vivants (**Gadelhak *et al.*, 2005**). Ils ont également la capacité de coloniser les surfaces racinaires des plantes, protégeant ainsi la plante contre la pression des phytopathogènes. Ces agents de lutte biologique entrent en compétition pour les nutriments et l'espace avec les phytopathogènes ; ils synthétisent

également des enzymes extracellulaires qui attaquent les parois cellulaires des champignons phytopathogènes et ils ont la capacité de produire des spores résistantes à la dessiccation pour survivre en cas de carence en eau (**González-Franco et Robles-Hernández, 2009**)

Les tests *in vitro* sont utilisés depuis le début de la recherche scientifique pour le criblage des nouveaux antagonistes microbiens, afin de tester l'effet inhibiteur de leurs métabolites secondaires sur la germination des spores ou la croissance des hyphes des agents pathogènes. L'activité inhibitrice peut être quantifiée sur des milieux nutritifs spécifiques testant les effets des microorganismes antagonistes cultivés en double culture. Les métabolites secondaires présents dans le surnageant des cultures de fermentation de ces microorganismes peuvent également être extraits, identifiés et testés pour leur activité inhibitrice contre l'agent pathogène (**Köhl et al., 2019**). C'est pourquoi le criblage *in vitro* de l'activité antagoniste des isolats microbiens reste très importante comme première étape. Les études *in vitro* sont des techniques d'exécution d'une procédure donnée dans un environnement contrôlé en dehors d'un organisme vivant à l'aide de boîtes de Pétri et de tubes à essai (**Sudha et al., 2018**).

Le criblage *in planta* est une autre approche importante de l'évaluation et la confirmation du potentiel de biocontrôle chez les microorganismes. Il s'agit d'un examen qui se fait au niveau des plantes infectées par le pathogène (**Rauf, 2017**). Les expériences *in planta* sont réalisées dans l'environnement naturel de la plante en culture ou dans l'organisme lui-même sur l'un de ses tissus (feuilles, tiges, racines ou fruits). En effet, l'identification réussie des souches de biocontrôle *in vitro* ne se traduit pas toujours par des résultats de biocontrôle réussis *in planta* et les résultats de biocontrôle d'isolats antagonistes sont souvent variables dans les conditions de terrain malgré une inhibition claire observée dans les conditions de laboratoire (**Ran et al., 2005**). Le succès du biocontrôle est en outre influencé par la compétition avec les bactéries indigènes de la plante, par l'âge et l'espèce de la plante hôte (**Siddiqui et Shaukat, 2003**). Par conséquent, il est essentiel que le criblage *in vitro* soit couplé à une validation *in planta* de l'efficacité du biocontrôle sur les tissus végétaux pour développer des applications de biocontrôle réussies avec un potentiel fiable.

A côté des criblages *in vitro* et *in planta*, le criblage *in silico* est un moyen très prometteur pour l'identification de métabolites microbiens à potentiel de biocontrôle. Le terme «*in silico*» est défini comme un mot moderne généralement utilisé pour désigner une expérimentation effectuée par ordinateur et est lié aux termes biologiques plus connus *in planta* et *in vitro*. Actuellement, le développement précipité dans le domaine de la

bioinformatique a conduit au développement de différents algorithmes basés sur le calcul *in silico*, ce qui a considérablement économiser le temps et les coûts liés à la sélection et l'évaluation des molécules ayant un potentiel de biocontrôle, ainsi que les sites cibles actifs des phytopathogènes. Ces méthodes révolutionnaires sont également utiles pour comprendre le mécanisme moléculaire impliqué dans l'interaction des molécules bioactifs (dites ligands) avec leurs cibles enzymatiques potentiels (dites récepteurs). La modélisation moléculaire a donné de nouvelles dimensions pour étudier à la fois la chimie et les caractéristiques biologiques des différents métabolites bioactifs pour la lutte contre les maladies affectent les cultures (Singh *et al.*, 2021).

En plus de comprendre l'interaction protéine-inhibiteur, l'analyse *in silico* permet d'étudier d'autres caractéristiques, telles que l'efficacité de liaison du biofongicide avec sa cible protéique, l'étude des caractéristiques pharmacocinétiques des molécules bioactives potentielles et l'évaluation de la stabilité des complexes récepteur-ligands au biais de la simulation moléculaire dynamique (Jinal et Amaresan, 2020).

A la lumière de ce qui précède, et dans le but d'isoler des souches microbiennes antagonistes contre le phytopathogène de la tomate *Alternaria* sp. et de proposer de nouveaux biofongicides microbiens ayant un potentiel de biocontrôle contre ce champignon ; une étude basée sur les trois modes expérimentales *in vitro*, *in planta*, et *in silico* a été menée.

Une première étape d'isolement et de caractérisation de quelques souches fongiques et actinomycétales a été réalisée à partir de plusieurs sols de la région d'Oum El Bouaghi. En parallèle un autre isolement de l'agent phytopathogène cible *Alternaria* sp. a été réalisé sur des tomates infectées et confirmé sur la base des caractéristiques macro et microscopiques. Dans un deuxième temps, un criblage *in vitro* de l'activité antagoniste des isolats fongiques et actinomycétales a été réalisé par utilisation des techniques de confrontation sur gélose. Les isolats prometteurs ont été sélectionnés pour tester leurs filtrats de fermentation sur les souches phytopathogènes. Sur la base des résultats obtenus de ce test, un essai *in planta* a été mené pour évaluer le potentiel inhibiteur des meilleurs isolats antagonistes contre *Alternaria* sp. infectant le tissu végétal de la tomate.

Dans une deuxième étape, une étude computationnelle basée sur le criblage *in silico* du potentiel de biocontrôle de métabolites secondaires fongiques et actinomycétales a été réalisée. Dans cette partie, une recherche bibliographique de métabolites secondaires des deux groupes microbiens étudiés a été tout d'abord effectuer dans le but de prédire leur activité

inhibitrice contre des cibles enzymatiques potentielles impliquées dans différents processus de virulence chez quelques espèces phytopathogènes d'*Alternaria*. Pour cela, une approche de docking moléculaire a été utilisée. Les propriétés pharmacocinétiques des molécules bioactives potentielles ont également été prédites *in silico*. En fin une analyse de simulation moléculaire dynamique a été menée sur les métabolites bioactives pour évaluer leur stabilité moléculaire et les proposer comme des candidats biofongicides efficaces contre les espèces phytopathogènes d'*Alternaria*.

Revue bibliographique

« La science est le capitaine »

De *Léonard de Vinci*

Chapitre 1 : Contrôle biologique (Biocontrôle).

1. Définition du biocontrôle

Le terme de contrôle biologique et son synonyme abrégé de biocontrôle ont été utilisés dans différents domaines de la biologie, notamment la phytopathologie. En pathologie végétale, le terme s'applique à l'utilisation d'antagonistes microbiens pour supprimer les maladies afin de contrôler les populations de ravageurs de la récolte (**Cook, 1993**).

Selon le Conseil national de la recherche des États-Unis, les agents de lutte biologique devraient être définis comme l'utilisation d'organismes naturels ou génétiquement modifiés et l'utilisation de leurs gènes ou leurs produits métaboliques afin de réduire ou supprimer les effets nocifs des agents pathogènes (**khasa, 2017**).

Selon **Jyoti et Singh, (2016)** la définition du biocontrôle diffère selon la cible de suppression ; nombre, type et source d'agents biologiques ; et le degré et le moment de l'intervention. Plus généralement, le contrôle biologique est la suppression des activités nuisibles d'un organisme par un ou plusieurs autres types d'organismes, souvent appelés ennemis naturels. Selon **Guo, (2020)**, le contrôle biologique implique l'utilisation d'ennemis naturels pour réduire les populations de ravageurs. Il est rentable avec des conséquences environnementales négatives minimisées.

Selon **Mukerji, (2000)** un agent de lutte biologique idéal devrait posséder un certain nombre de caractéristiques, à savoir :

- Taux de survie élevé dans le sol pendant une période prolongée.
- Forte probabilité de contact avec l'agent pathogène.
- Actif dans les conditions environnementales requises.
- La multiplication de masse doit être simple et peu coûteuse.
- Doit être efficace et économique.
- Ne devrait pas être un risque sur la santé.

Les microorganismes utilisés en contrôle biologique sont principalement des bactéries, des champignons, des levures (**Gerbore, 2013**). Deux termes sont parfois rencontrés pour nommer ces derniers :

1. Celui de ABC, pour « Agent de biocontrôle », est utilisé pour le microorganisme dont l'action est directe sur l'agent pathogène.

2. Lorsque le microorganisme a une action sur la plante, le terme de PGPM microorganismes favorisant la croissance des plantes « en anglais Plant Growth Promoting Microorganism » est employé pour les micro-organismes ont le potentiel d'augmenter la croissance des cultures en améliorant l'efficacité de l'utilisation des nutriments, en tolérant les stress biotiques et abiotiques et en résistant aux maladies (**Sellitto et al., 2021**). Ce groupe de microorganismes inclus les PGP-B pour les bactéries, PGP-F (Fungi) pour les champignons, PGP-Y (Yeast) pour les levures et PGP-R pour les rhizobactéries.

Les différents agents microbiens de lutte biologique les plus communément connus sont *Agrobacterium* sp., *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp. qui sont des agents bactériens et *Aspergillus* spp., *Penicillium* sp., *Ampelomyces* sp., *Candida* sp., *Coniothyrium* sp., *Gliocladium* sp. et *Trichoderma* spp. qui sont des agents fongiques (**Gawai, 2018**).

Les actinomycètes, et en particulier les espèces de *Streptomyces*, développent des interactions symbiotiques avec les plantes en les protégeant de divers pathogènes ; en même temps, les exsudats végétaux favorisent la croissance de *Streptomyces* ; cette interaction se fait par la production d'un ensemble d'antibiotiques appropriés pour lutter contre les maladies causées par des champignons phytopathogènes (**Vurukonda et al., 2018**).

2. Mécanismes de lutte biologique

Les mécanismes de biocontrôle peuvent impliquer des interactions entre l'antagoniste et l'agent pathogène directement. Ces interactions peuvent avoir lieu au niveau des racines ou dans la partie aérienne de la plante, comme peuvent se manifester au niveau du sol rhizosphérique. De plus, des interactions indirectes sont connues lorsque la plante elle-même répond à la présence de l'antagoniste, ce qui entraîne une résistance induite ou une stimulation de la croissance des plantes (**Pankhurst et Lynch 2005**). Les agents de lutte biologique peuvent induire une résistance aux infections contre un agent pathogène dans les tissus végétaux sans interaction directe entre le pathogène et l'antagoniste. Une interaction directe avec les agents pathogènes peut se manifester par une compétition pour les nutriments et l'espace. Les antagonistes peuvent également interagir directement avec l'agent pathogène par hyperparasitisme ou antibiose. La production de métabolites secondaires antimicrobiens ayant des effets inhibiteurs contre les agents pathogènes est un autre mode d'action directe (**Köhl et al., 2019**). Plusieurs modes d'action des agents microbiennes de lutte biologique ont été identifiés (**Figure 1**).

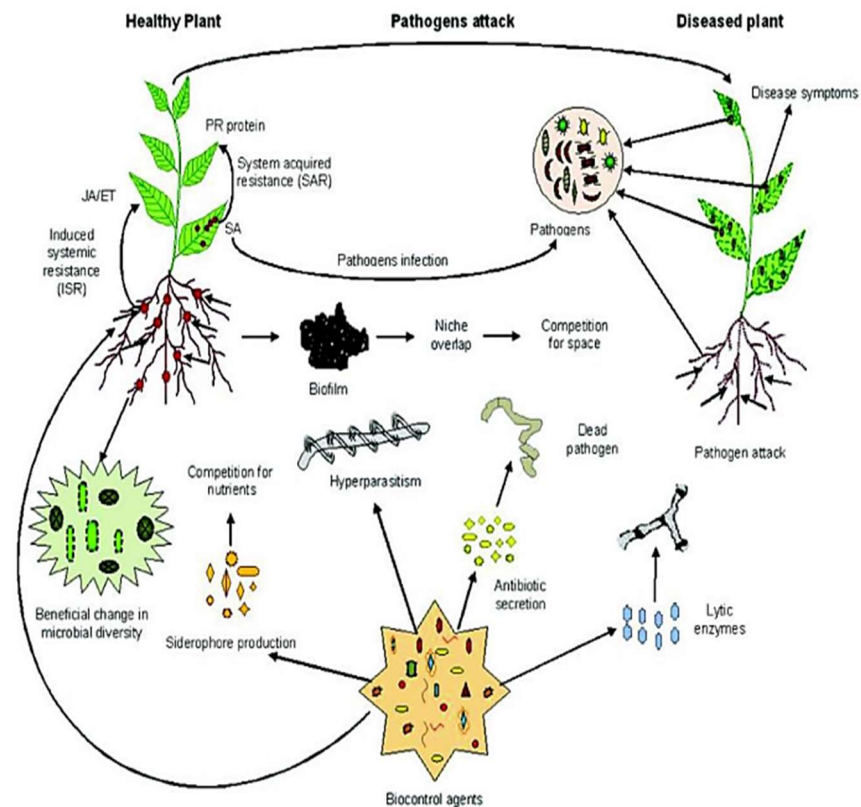


Figure 1. Mécanismes d'actions mis en œuvre par les agents de lutte biologique pour la gestion des maladies des plantes (Singh, 2014).

2.1. Interaction directe

Dans la voie directe du contrôle de la maladie, les agents de biocontrôle agissent par un effet antagoniste direct sur l'agent pathogène, englobant l'antibiose, le parasitisme, la réduction de la virulence de l'agent pathogène, et la pression d'infection par compétition. (Lahlali *et al.*, 2022).

2.1.1. Parasitisme

Le parasitisme est l'interaction compétitive directe entre deux organismes dans lesquels un organisme obtient des nutriments de l'autre. Le parasitisme se produit lorsqu'un antagoniste se nourrit sur ou dans l'agent pathogène. Il provoque la destruction immédiate des agents pathogènes affectés. Si l'hôte est également un parasite, par exemple un pathogène végétal, l'interaction est définie comme l'**hyperparasitisme**. Ce type d'interaction est souvent observé entre les champignons. Pour les bactéries, l'hyperparasitisme a rarement été signalé.

Bdellovibrio bacteriovorus est une bactérie prédatrice qui a la propriété inhabituelle d'utiliser le cytoplasme d'autres bactéries à Gram négatif comme nutriments (McNeely *et al.*, 2017).

Chez les champignons, le parasitisme est un mode d'action qui joue un rôle dans la réduction des maladies des plantes où l'espèce cible sert de source de nutriments pour les champignons de lutte biologique. Ce mode d'action est appelé **mycoparasitisme**. Il s'agit d'un processus complexe qui implique des événements séquentiels. La première étape comprend la reconnaissance de l'hôte. La deuxième étape est le contact direct avec l'hôte, suivi de la sécrétion d'enzymes lytiques extracellulaires pour détruire la paroi cellulaire (Zaki *et al.*, 2020).

Le mycoparasitisme est divisé en deux types, différenciés selon l'agressivité du parasite envers son hôte. Le **nécotrophe**, où les parasites ont un mode d'action destructeur, conduit à la mort des organismes hôtes. Dans le mycoparasitisme **biotrophique**, le développement du parasite est favorisé par la survie des hôtes plutôt que par leur mort (Benítez *et al.*, 2004).

2.1.2. Antibiose

La plupart des microorganismes impliqués dans la lutte biologique fonctionnent au moyen d'une antibiose, dans laquelle un métabolite produit par un microorganisme a un effet néfaste sur l'autre, inhibant ainsi sa croissance. La production de métabolites peut entraîner une lyse et une dissolution complète de la structure cellulaire (Oliveira *et al.*, 2020). Dans ce cas l'activité de biocontrôle basée sur la sécrétion de molécules qui tuent ou réduisent la croissance du pathogène cible (Lugtenberg et Kamilova, 2009).

L'antibiose est définie comme l'inhibition ou la destruction d'un microorganisme par des substances telles que des métabolites spécifiques ou non spécifiques, des agents lytiques ou des enzymes qui sont produites par un autre microorganisme (Melin *et al.*, 2007).

2.1.2.1. Les antibiotiques

Le troisième dictionnaire international de Webster (1981) définit un antibiotique comme « une substance produite par un microorganisme (comme une bactérie ou un champignon) ayant la capacité d'inhiber la croissance ou tuer un autre microorganisme (Davies, 2006). La production d'un ou de plusieurs antibiotiques est le mécanisme le plus souvent associé à la capacité des bactéries favorisant la croissance des plantes à agir comme agents antagonistes contre les phytopathogènes (Glick *et al.*, 2007).

Selon **Reddy (2014)**, les antibiotiques de la lutte biologique sont divisés en deux catégories :

A- Les antibiotiques non volatiles :

- Polycétides (2,4-diacétylphloroglucinol, pyolutéorine, mupirocine)
- Composés azotés hétérocycliques (dérivés de la phénazine)
- Phénylpyrrole (pyrrolnitrine)
- Lipopeptides cycliques
- Lipopeptides (iturine, bacillomycine, plipastatine, surfactine)
- Aminopolyols (zwittermycine A)

B- Les antibiotiques volatiles :

- Cyanure d'hydrogène
- Aldéhydes
- Alcools
- Cétones
- Sulfure

2.1.2.2. Les bactériocines

Une bactériocine est définie comme une substance protéique qui présente une activité bactéricide contre des organismes étroitement apparentés (**Udhayashree *et al.*, 2012**).

Les bactériocines ont un grand potentiel d'utilisation comme traitement prophylactique des germes pathogènes transmis par les semences ou les tubercules, la prévention de la propagation secondaire des bactéries pathogènes des plantes infectées et la protection des cultures de grande valeur contre les pathogènes bactériens des plantes (**Mojgani, 2017**).

Les bactériocines fonctionnent en formant des pores dans la membrane des cellules cibles et en épuisant le potentiel transmembranaire. Il en résulte une fuite de matériaux cellulaires (**Cleveland *et al.*, 2001**).

2.1.2.3. Les enzymes

Un autre type de molécule fortement impliqué dans la lutte biologique est les enzymes. Ceux-ci sont capables de cliver des composés polymères, tels que la chitine, les protéines, la cellulose, et même l'ADN, et ils peuvent également interférer avec le métabolisme des agents

pathogènes, inhibent la germination des conidies et lysent le tube germinatif (**Roca-Couso et al., 2021**).

Le rôle des enzymes dans la lutte biologique peut souvent être attribué au parasitisme et à l'antibiose. En particulier, les enzymes dégradant la paroi cellulaire telles que les chitinases, les α -1,3-glucanases, les protéases et les cellulases, sont non seulement des caractéristiques importantes des mycoparasites pour la colonisation de leurs champignons hôtes, mais peuvent également présenter une activité antifongique considérable par elles-mêmes. L'un de ses principaux mécanismes, l'antibiose, repose sur la reconnaissance de la liaison et la perturbation enzymatique de la paroi cellulaire (**Haggag et Mohamed, 2007**).

2.1.2.4. Les composées volatiles

En règle générale, les micro-organismes libèrent un mélange de composés organiques volatils (COV) qui sont engagés dans la communication inter et intra-organisme. Ces composés appartiennent à diverses classes chimiques ; cependant, partagent certaines propriétés communes comme la lipophilicité, la faible masse moléculaire (≤ 300 Da) (**Effmert et al., 2012**).

Les substances volatiles des plantes peuvent être utilisées pour surveiller les insectes dans les programmes de lutte biologique (**Wheeler et Schaffner, 2013**).

De nombreux microorganismes dus à la production de composés organiques volatils (COV) se sont révélés favoriser la croissance des plantes et améliorer la productivité des cultures (**Li et al., 2019**).

Ces dernières années, une attention accrue a été accordée aux COV produits par les microorganismes en tant qu'agents de lutte biologique. Par exemple, le 3-méthyl-1-butanol et le 2-méthyl-1-butanol produits par *S. cerevisiae* pourraient inhiber le développement de *Phyllosticta citricarpa* qui provoque des taches noires d'agrumes (**Toffano et al., 2017**).

2.1.3. Compétition

C'est une concurrence pour les nutriments, l'espace ou les sites d'infection. La concurrence entre l'antagoniste et les agents pathogènes en tant que mécanisme de lutte biologique peut se produire à différents niveaux. Par exemple, la compétition pour l'espace ou des sites d'infection spécifiques sur les racines ou les graines a été proposée comme mécanisme de lutte biologique contre le pathogène *Fusarium oxysporum* par des souches non

pathogènes de *F. oxysporum* et de souches pathogènes de *Rhizoctonia solani* par *Rhizoctonia* spp. non pathogène. Dans les deux cas, l'agent pathogène est exclu par la colonisation plus rapide et étendue de la surface raculaire par la souche de lutte biologique (Admassie *et al.*, 2019).

2.1.3.1. Production de sidérophores

Les sidérophores (sidéro grec signifiant fer et phore signifiant porteur) sont des composés organiques de faible poids moléculaire (<10 KDa). Ce sont des chélateurs du fer de haute affinité produits par des microorganismes comme les bactéries, les champignons et par certaines plantes en condition de carence en fer. Les microbes favorisant la croissance des plantes (PGPM) et les agents de lutte biologique (BCA) produisent des sidérophores qui sont des facteurs importants pour la promotion de la croissance des plantes et la suppression des maladies (Ghosh *et al.*, 2017).

2.1.3.2. Quorum Sensing

Le quorum sensing (QS) est un mécanisme dépendant de la population où les bactéries communiquent entre elles avec molécules de signal chimique pour réguler l'expression des gènes de processus variés comme la bioluminescence, formation de biofilm et la compétence (Vesuna et Nerurkar, 2020).

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) sont largement présentes dans la rhizosphère. Ils améliorent la croissance des racines et offrent à la plante des opportunités d'obtenir un maximum de nutriments pour une meilleure croissance. Outre la promotion de la croissance, les PGPR ont un certain nombre de fonctions telles que la tolérance au stress (chaleur, sécheresse, salinité et maladie), la bioremédiation des métaux lourds, et la biodégradation des composés organiques toxiques complexes. Les agents de lutte biologique principalement associé aux racines ont une contribution majeure dans la formation de biofilms très denses, c'est pourquoi *Pseudomonas* est utilisé comme organisme modèle dans l'étude du biofilm grâce au Quorum Sensing (Rafique *et al.*, 2015).

2.2. Interaction indirecte

Les mécanismes indirects de lutte biologique comprennent l'induction de la résistance en stimulant les réactions de défense des plantes et la production des hormones végétales (Heydari et Pessaraki, 2010).

2.2.1. Résistance systémique induite

Les plantes possèdent un système immunitaire inné qui reconnaît et répond à la présence de microorganismes, cette réponse induit une résistance appelée résistance systémique induite. Cette activité est suggérée pour contribuer à leur activité de biocontrôle. Par exemple, les espèces *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodosporidium paludigenum*, *Candida saitoana*, *C. oleophila* induisent une réponse immunitaire innée et provoquent éventuellement une résistance aux agents pathogènes de la phyllosphère dans les fruits (**Freimoser et al., 2019**).

La résistance systémique acquise (SAR) est la résistance déclenchée par une infection pathogène liée à une augmentation du niveau d'acide salicylique suivie de l'activation des protéines liées à la pathogénèse. Tandis que la résistance systématique induite (ISR) est une résistance induite par des bactéries « non pathogènes » de lutte biologique. L'éthylène et l'acide jasmonique sont nécessaires pour la réponse ISR, bien que les lipopolysaccharides, les sidérophores ou les flagelles puissent également l'activer (**Patel et al., 2020**).

2.2.2. Hormones végétales

Les phytohormones sont des molécules de signalisation qui sont essentielles pour la régulation de la croissance et du développement des plantes ainsi que pour les réponses des plantes aux stress biotiques et abiotiques (**Berger et al., 2020**).

Ces substances organiques sont capables de modifier les fonctions physiologiques et la croissance des plantes, même à faible concentration. Les phytohormones sont divisées en cinq catégories principales : les auxines, les cytokinines, l'éthylène, les gibbérellines (GA) et l'acide abscisique (ABA). Un faible niveau d'acide indole-acétique (IAA), c'est-à-dire le principal représentant du groupe des auxines des phytohormones, stimule l'élongation des racines, tandis qu'un niveau élevé influence la formation de racines latérales et adventives. Les GA contrôlent les processus de développement des plantes, y compris la germination des graines, l'extension de la tige, la floraison et le vieillissement (**Jaroszuk-Scisel et al., 2019**).

3. Les microorganismes utilisés en biocontrôle

3.1. Les bactéries

Plusieurs espèces de champignons et de bactéries ou leurs métabolites sont aujourd'hui produits commercialement et appliqués à l'environnement dans l'agriculture, l'horticulture et la foresterie pour la lutte biologique. Ce contrôle est appelé également le contrôle microbien qui est un terme utile pour décrire l'utilisation de microorganismes comme agents de contrôle

biologique (**Madsen, 2011**). Le principal avantage de l'utilisation des agents de biocontrôle est qu'ils sont hautement spécifiques pour un agent pathogène et sont donc considérés comme inoffensifs pour les espèces non ciblées (**O'Brien, 2017**). Il y a eu un intérêt croissant pour l'utilisation des agents microbiens dans la protection des plantes et la promotion de la croissance des plantes vers l'évolution des technologies respectueuses de l'environnement et l'ouverture de nouveaux domaines de l'exploitation microbienne. Les agents de lutte biologique ne sont pas limités à un groupe bactérien spécifique ; cependant, étant donné la diversité de la microflore de la rhizosphère, il est probable que le spectre complet des souches potentiellement efficaces a à peine été exploré. Beaucoup de ces agents de lutte biologique sont efficaces dans les conditions de terrain (**Weller, 1988**).

3.1.1. *Bacillus*

Les espèces de *Bacillus* sont des bactéries Gram-positives en forme de bâtonnets, aérobies ou facultativement anaérobies ; dans certaines espèces, les cultures peuvent devenir Gram-négatives avec l'âge. Les nombreuses espèces du genre présentent un large éventail de capacités physiologiques qui leur permettent de vivre dans tous les milieux naturels. Une seule endospore est formée par cellule. Les spores résistent à la chaleur, au froid, aux radiations, à la dessiccation et aux désinfectants (**Turnbull et al., 1991**).

Bacillus est le genre le plus abondant dans la rhizosphère, et l'activité PGPR de certaines de ces souches est connue depuis de nombreuses années, ce qui permet une large connaissance des mécanismes impliqués. Il existe un certain nombre de métabolites libérés par ces souches (**Charest et al., 2005**), qui affectent fortement l'environnement en augmentant la disponibilité des nutriments des plantes. Les espèces de *Bacillus* sont naturellement présentes à proximité immédiate des racines des plantes (**Sivasakthi et al., 2014**).

3.1.1.1. *Bacillus thuringiensis*

Communément appelé Bt, est une bactérie naturelle unique qui a une longue histoire de recherche. C'est le biopesticide le plus ancien et le plus utilisé comme agent antiparasitaire. La qualité particulière de Bt qui le rend unique est la présence de gènes formant des cristaux insecticides et parasporaux sur son plasmide. Ces protéines cristallines sont de nature toxique et entraînent la mort d'insectes en formant des pores dans l'intestin des parasites hôtes (**Saxena et al., 2019**).

3.1.1.2. *Bacillus subtilis*

Cette espèce est omniprésente dans le sol, peut favoriser la croissance des plantes, les protéger contre les attaques de pathogènes fongiques et joue un rôle dans la dégradation des polymères organiques dans le sol (Emmert et Handelsman, 1999).

Des souches commerciales de *B. subtilis* ont été commercialisées comme agents de lutte biologique contre les maladies fongiques des cultures. Le biofongicide commercial, Serenade, qui contient une souche de *B. subtilis*, serait efficace contre une variété de bactéries pathogènes, notamment les souches *Erwina*, *Pseudomonas* et *Xanthomonas*. Le mécanisme de cet effet antibactérien est incertain, bien qu'il soit connu que *B. subtilis* peut produire une variété d'agents antibactériens, y compris un large spectre de lipopeptides, tels que la surfactine, qui sont de puissants biosurfactants (Peypoux *et al.*, 1999 ; Bais *et al.*, 2004).

3.1.1.3. *Bacillus pumilus*

B. pumilus est une rhizobactérie qui favorise la croissance des plantes et qui est reconnue pour son rôle dans la suppression naturelle de différentes maladies des plantes (Devkota *et al.*, 2020).

Il est également utile comme un outil biotechnologique pour la lutte antiparasitaire. L'un des principaux mécanismes de lutte biologique utilisés par *B. pumilus* est l'antibiose (Xu *et al.*, 2020).

Munimbazi et Bullerman, (1998) ont décrit des métabolites antifongiques produits par *B. pumilus* qui ont inhibé la croissance mycélienne des espèces *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* ainsi Shali *et al.*, (2010) démontrent que la chitinase produite par *B. pumilus* est impliquée dans l'inhibition hyphale des champignons phytopathogènes.

3.1.1.4. *Bacillus amyloliquefaciens*

B. amyloliquefaciens se distribue largement dans la surface des plantes, le sol et l'air. Au cours du processus métabolique, il produit une masse de substances bioactives qui ont une activité antibactérienne, immunocompétence, et antioxydante (Xiaolong *et al.*, 2019).

B. amyloliquefaciens a été largement utilisé comme probiotique dans le domaine de la lutte biologique, et ses composés antibactériens jouent un rôle important dans la prévention et la lutte contre les maladies des plantes et des volailles. Il présente les avantages de la sécurité et de l'efficacité (Wang *et al.*, 2020).

B. amyloliquefaciens produit de nombreux types d'enzymes telles que l'alpha-amylase et la protéase, et présente une résistance élevée au stress environnemental (Du *et al.*, 2018).

Abdallah *et al.*, (2018) ont indiqué que les antibiotiques de famille lipopeptides de *B. amyloliquefaciens* pourraient agir comme des composés de lutte biologique prometteurs pour réduire le pathogène végétal *Agrobacterium tumefaciens*.

3.1.1.5. *Bacillus firmus*

B. firmus a été largement décrite et caractérisée comme l'une des bactéries nématocides les plus potentielles, dans ces dernières années. De nombreuses études ont démontré que *B. firmus* est efficace contre les nématodes. L'exemple le plus connu et bionématicide « bionem » produit par cette bactérie (Mendoza *et al.*, 2008).

Récemment, *B. firmus* a été décrit comme une bactérie nématophage importante. Plusieurs études ont démontré que *B. firmus* contrôle efficacement plusieurs parasites, comme le nématode à galles, le nématode à kyste du soja et le nématode à tige par la production d'enzyme protéase qui dégrade les tissus intestinaux des nématodes (Geng *et al.*, 2016).

3.1.1.6. *Bacillus licheniformis*

Le mécanisme de lutte biologique de *B. licheniformis* comprend la production d'antibiotiques, l'induction de la résistance de l'hôte et la promotion de la croissance de l'hôte (Li *et al.*, 2020). Cette bactérie possède de nombreuses caractéristiques physiologiques telles que la production d'endospores pour résister à divers environnements défavorables et la production de diverses substances antimicrobiennes, telles que des lipopeptides, des peptides, des phospholipides, des polyènes, des acides aminés et des acides nucléiques, qui peuvent inhiber divers agents pathogènes. *B. licheniformis* également possède une puissante activité protéase, lipase amylase, glucanase et chitinase et est donc largement utilisé dans les applications de biocontrôle pour protéger l'environnement (Ji *et al.*, 2020).

3.1.1.7. *Bacillus megaterium*

B. megaterium est une bactérie bénéfique utilisée comme agent de lutte biologique contre les champignons *Rhizoctonia solani*, *Fusarium sacchari* et *Curvularia lunata*, qui attaquent les plants de riz (Kanjamaneeesthian et Meeturum, 2019).

3.1.1.8. *Bacillus mycooides*

Bactérie saprophyte qui est capable de produire des endospores et couramment présentes dans les sols et l'environnement de la rhizosphère végétale. *B. mycooides* a été utilisé comme agent respectueux de l'environnement pour solubiliser le charbon brun et synthétiser des plastiques et des produits chimiques biodégradables tels que le 2,4,6-trinitrotoluène. En agriculture, *B. mycooides* est souvent utilisé comme agent de lutte biologique pour contrôler les ravageurs du tabac (Peng *et al.*, 2017).

Cette bactérie favorise la libération de fer par son activité de production de sidérophore. De plus, grâce au déclenchement d'une résistance systématique induite (ISR) par cette bactérie, diverses maladies peuvent être réduites significativement. Le potentiel de lutte biologique de *B. mycooides* contre les agents pathogènes des plantes *Sclerotinia sclerotiorum* ou *Botrytis cinerea* est basé sur la production bactérienne de produits antimicrobiens tels que la bacillomycine D, la fengycine, la zwittermicine A (Yi *et al.*, 2018).

3.1.2. *Pseudomonas*

Pseudomonas sont des bactéries aérobies à Gram négatif, omniprésentes dans les sols agricoles et bien adaptées à la rhizosphère. Les pseudomonades possèdent de nombreux traits qui les rendent des excellents agents de lutte biologique. Il s'agit notamment de la capacité de croître rapidement et d'être produit en masse ; utiliser rapidement les exsudats de graines et de racines ; coloniser et se multiplier dans la rhizosphère ; produire un large spectre de métabolites bioactifs (c.-à-d. antibiotiques, sidérophores, volatiles et substances favorisant la croissance) ; concurrencer agressivement d'autres microorganismes ; et s'adapter aux contraintes environnementales (Weller *et al.*, 2002 ; Weller, 2007).

Les *Pseudomonas* possèdent de nombreux traits qui les rendent bien adaptés en tant qu'à agents de biocontrôle. La promotion directe de la croissance des plantes par les *Pseudomonas* PGPR implique généralement de fournir à la plante un composé synthétisé par la bactérie ou de faciliter l'absorption des nutriments de l'environnement. Les mécanismes directs de la promotion de la croissance des plantes impliqués par cette bactérie sont (1) la production de phytohormones (indole acide acétique IAA, cytokinines, Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Désaminase) et, (2) la fixation de l'azote, (3) la production de sidérophore et (4) la solubilisation du phosphate (Panpatte *et al.*, 2016).

3.1.2.1. *Pseudomonas fluorescens*

P. fluorescens est un agent de lutte biologique prometteur qui peut inhiber une variété d'agents pathogènes des plantes, tels que *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* et *Botrytis cinerea*, mais en raison de sa faible résistance à la chaleur, son taux de survie est faible (**Chen et al., 2019**).

Les mécanismes d'action antagonistes utilisés par *P. fluorescens* contre les agents pathogènes fongiques comprennent la production de composés volatils compétitifs au fer, d'antibiotiques tels que la pyrrolnitrine et le 2,4-diacétylphloroglucinol et l'induction d'une résistance systémique de l'hôte (**Wallace et al., 2017**).

3.1.2.2. *Pseudomonas chlororaphis*

Cette bactérie est l'un de ces organismes qui supprime la pourriture des tiges de canola causée par l'agent pathogène fongique *Sclerotinia sclerotiorum*. L'inhibition directe des agents pathogènes résulte de l'exposition à des produits bactériens sécrétés, notamment les antibiotiques pyrrolnitrine (PRN) et phénazine (PHZ), les chitinases, les protéases, les lipases et les sidérophores. Cette bactérie exerce également ses effets indirectement en amorçant la réponse de défense des plantes, ce qui permet à la plante de repousser plus efficacement (**Shah et al., 2020**).

3.1.2.3. *Pseudomonas putida*

P. putida est une bactérie saprophytique du sol qui a la capacité de coloniser la racine des plantes cultivées. C'est un agent de lutte biologique bien établi qui offre des avantages de croissance à la plante (**Bernal et al., 2017**).

Cette bactérie réduit efficacement les populations de *Phytophthora citrophthora* et *P. parasitica*, les agents responsables du pourridié des agrumes. Elle adhère activement aux hyphes de *Phytophthora*, restreint la croissance du pathogène in vitro et produit un sidérophore chélatant le fer, la pyoverdine (**Steddom et Menge, 2001**).

3.1.3. Rhizobacterium

Rhizobium et ses alliés (*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Sinorhizobium*) sont des bactéries à Gram négatif qui provoquent le développement de nodules racinaires (et parfois de tige) sur les plantes hôtes (**Long, 1996**).

Les rhizobiums sont un groupe d'organismes bien connus pour leur capacité à coloniser les surfaces racinaires et à former des associations symbiotiques avec les légumineuses. Ils jouent non seulement un rôle majeur dans la fixation biologique de l'azote, mais améliorent également la croissance des plantes et réduisent l'incidence des maladies dans diverses cultures. Les rhizobiums sont connus pour contrôler la croissance de nombreux champignons pathogènes des plantes d'origine tellurique appartenant à différents genres comme *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium* et *Macrophomina* (Das *et al.*, 2017).

Les mécanismes impliqués dans la lutte biologique contre les champignons pathogènes par les rhizobiums comprennent le mycoparasitisme, la production d'antibiotiques et les métabolites secondaires antifongiques, y compris le cyanure d'hydrogène (HCN), des enzymes lytiques, la production de sidérophores, la compétition pour le fer entre les agents pathogènes et les rhizobiums, la compétition pour les nutriments, l'induction de la défense des plantes et la promotion de la croissance des plantes, ce qui réduit la sensibilité aux attaques pathogènes (Arora *et al.*, 2001; Huang et Erickson, 2007).

3.1.4. *Agrobacterium*

Tous les membres du genre *Agrobacterium* sauf *A. radiobacter* induit une hypertrophie corticale des parties supérieures des racines (*A. tumefaciens* et *A. rubi*) ou croissance anormale des racines (*A. rhizogenes*) sur de nombreux types de plantes (Sawada *et al.*, 1993).

A. radiobacter K84 est utilisé dans le commerce pour lutter contre la galle du collet, une maladie végétale tumorigène causée par un pathogène omniprésent dans le sol, *A. tumefaciens* (Stockwell *et al.*, 1993).

3.1.5. *Enterobacter*

Les espèces d'*Enterobacter* sont des bactéries Gram-négatives appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* et au genre *Enterobacter* (Abbott, 2011).

Les membres de ce genre sont le plus souvent isolés de l'environnement, en particulier du sol, des plantes et des fruits, mais aussi de sources humaines (Peng *et al.*, 2009).

Plusieurs souches d'*Enterobacter* qui colonisent les racines des plantes ont été étudiées comme rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et améliorant leur rendement (Saleh et Glick, 2001).

Des souches d'*E. Cloacae* et d'*E. Agglomerans* se sont révélées produire des sidérophores comme l'entérochéline et l'aérobactine et différents métabolites antifongiques volatils et non volatils. La compétition pour les nutriments et la capacité de colonisation de la rhizosphère ont été considérées comme des mécanismes possibles de l'activité antifongique chez *E. cloacae* et *E. agglomerans* (Chernin *et al.*, 1995).

3.1.6. *Serratia*

L'espèce *Serratia* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae* et est omniprésente dans l'environnement (Williams *et al.*, 2019). Beaucoup de ces isolats sont connus pour avoir des capacités favorisant la croissance des plantes (PGP) et/ou un potentiel de lutte biologique basés sur l'antibiose (production de prodigiosine et pyrrolnitrine) et la production d'enzymes lytiques (chitinases et β -1,3-glucanases) contre les champignons fongiques présents dans le sol (Chakraborty *et al.*, 2010).

Parmi les mécanismes par lesquels le genre *Serratia* exerce des effets bénéfiques sur les plantes, ils facilitent l'absorption de nutriments tels que le phosphore via la solubilisation du phosphate et la production de sidérophores. En plus, ces bactéries synthétisent des phytohormones stimulantes comme l'acide indole-3-acétique qui participent à la promotion de la croissance des plantes (Kshetri *et al.*, 2019).

Serratia sp. provoque également une résistance systémique induite (ISR) où l'amélioration de la capacité défensive de la plante contre divers agents pathogènes et ravageurs des plantes est acquise après une stimulation appropriée (Ryu *et al.*, 2013).

3.1.7. *Azospirillum*

Les bactéries du genre *Azospirillum* sont des microaérophiles à Gram négatif, non fermentatives et chimiorganotrophes qui appartient à la classe des *Alphaprotéobactéries*. Ces bactéries réduisent également le nitrate (NO_3^-) dans les racines, favorisant la croissance des plantes en raison de la baisse des dépenses énergétiques qui en résulte pour la réduction des nitrates en ammoniac (Fages, 1994).

D'autres mécanismes indirects par lesquels les bactéries *Azospirillum* peuvent favoriser la croissance des plantes sont en réduisant l'apparence des champignons ou pathogènes du sol via la production de sidérophores, chitinases, glucanases et antibiose. L'auxine, en particulier l'acide indole-3-acétique, est la principale hormone favorisant la croissance des racines.

Azospirillum produisent cet acide en plus d'autres composés indoles tels que cytokinines et gibberellines (Duarte *et al.*, 2020).

Azospirillum spp. est utilisé comme un herbicide (Bouillant *et al.*, 1997) et un fongicide contre *Fusarium*, *Rhizoctonia* et *Sclerotinia* (Hassouna *et al.*, 1998).

Mehnaz, (2015) donne un exemple d'AzoGreen qui est un produit ne contient que *A. brasilense*. Son utilisation est recommandée comme tégument pour améliorer la germination des graines, la prolifération du système racinaire, la résistance à la sécheresse et la santé des plantes.

3.1.8. Les Actinomycètes

Les actinomycètes, une bactérie Gram positive, bien connue comme source d'antibiotiques, possèdent également un potentiel pour contrôler divers agents pathogènes des plantes, en plus d'agir comme agent favorisant la croissance des plantes. Ces agents microbiens peuvent remplacer substantiellement les pesticides chimiques nocifs. Les actinomycètes commencent à trouver une place en tant qu'intrant important dans les pratiques agricoles (Chaurasia *et al.*, 2018).

Mycostop et Actinovate sont deux formulations à base d'actinomycètes disponibles dans le monde entier pour une utilisation en maraîchage en remplacement des formulations chimiques (Chaurasia *et al.*, 2018).

Les actinomycètes ont été largement exploités principalement à cause de leur capacité à produire des composés bioactifs, tels que des antibiotiques et des enzymes lytiques (Clardy *et al.*, 2006). En fait, les antibiotiques produits par ces bactéries filamenteuses, principalement *Streptomyces* spp., pourraient inhiber le développement d'une large gamme de champignons et/ou de bactéries phytopathogènes (Berg *et al.*, 2001). Également ces composés ont souvent été considérés comme l'un des outils les plus importants pour lutter contre les maladies transmises par le sol (Buchenauer, 1998) avec un faible effet toxique pour les humains et les animaux, caractéristiques bien souhaitées pour les besoins des nouveaux consommateurs (Cardoso *et al.*, 2010 ; Costa *et al.*, 2013).

La production d'enzymes chitinolytiques et de sidérophores est un mode d'action supplémentaire connu pour l'inhibition de la croissance fongique par les actinobactéries. Les actinobactéries peuvent produire des enzymes qui dégradent les parois des cellules fongiques,

notamment par la production de chitinases. Plus de 90% des microorganismes chitinolytiques sont des actinomycètes. Ceux-ci ont été largement étudiés au cours des deux dernières décennies (Gupta *et al.*, 1995 ; Vurukonda *et al.*, 2018).

3.1.8.1. *Streptomyces*

Streptomyces est le genre le plus connu des actinomycètes. Ces bactéries sont largement utilisées comme agents de lutte biologique (Figure 2). Les espèces de *Streptomyces* ont d'excellentes capacités de produire une variété de composés bioactifs, tels que des molécules antibactériennes, antifongiques, antivirales, anticancéreuses et antioxydantes (Newitt *et al.*, 2019).

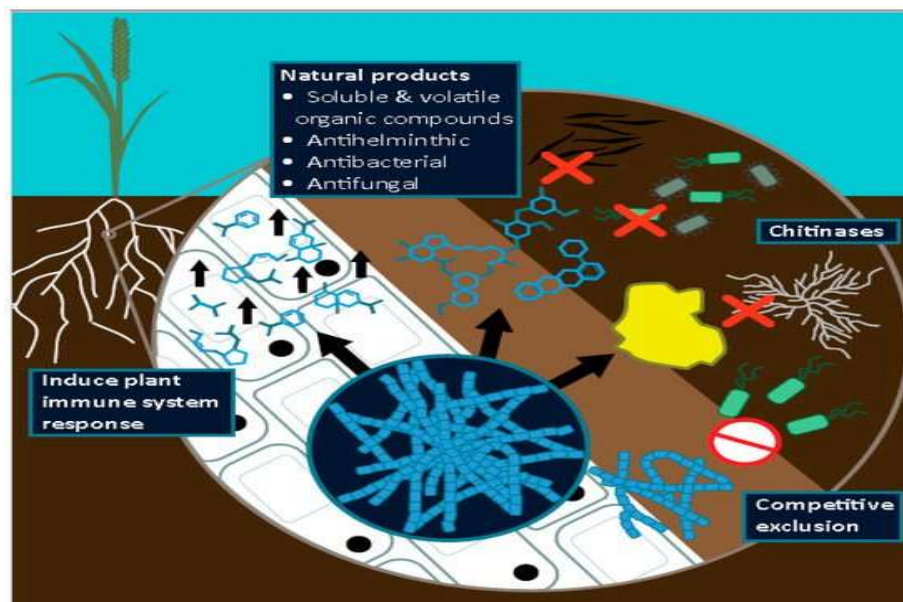


Figure 2. Résumé des principaux mécanismes de lutte biologique par *Streptomyces* contre les maladies des plantes (Newitt *et al.*, 2019).

Certains antibiotiques produits par *Streptomyces* ont été utilisés comme fongicides pour le contrôle de la déflagration du riz, comme le Blasticidin-S et Kasugamycin (Copping et Ducke, 2007 ; Chaiharn *et al.*, 2020).

Les *Streptomyces* sont également capables de produire un ensemble d'enzymes cellulolytiques et hydrolytiques dont les plus connues sont les chitinases et les glucanases qui pourraient permettre une entrée forcée dans le matériel végétal en brisant les parois cellulaires épidermiques et les lamelles moyennes entre les cellules végétales pendant le parasitisme (Viaene *et al.*, 2016).

Compte tenu de leur capacité à coloniser les racines des plantes et à produire des métabolites secondaires antimicrobiens puissants, le genre *Streptomyces* devient un choix de plus en plus évident lors de la recherche de nouveaux agents de lutte biologique. Ce genre contribue fréquemment à la promotion de la croissance des plantes dans des conditions environnementales ambiantes et stressantes, telles qu'une salinité élevée (Patel *et al.*, 2018 ; Chaurasia *et al.*, 2018).

Certains *Streptomyces* spp. ont été développés avec succès autant qu'agents de lutte biologique commerciaux et testés pour le contrôle d'autres maladies des plantes (Tableau 1). Par exemple, *S. griseoviridis* souche K61 (Mycostop), qui a été testée pour le contrôle de *Ceratocystis radicola* qui provoque le roussissement noir sur le palmier dattier et des agents pathogènes terrestres de la tomate tels que *Fusarium oxysporum f. lycopersici*, *Alternaria alternata* et *Verticillium dahliae* (Suleman *et al.*, 2002 ; Minuto *et al.*, 2006 ; Law *et al.*, 2017).

Tableau 1. Liste des produits à base de *Streptomyces* spp. disponibles sur le marché mondial (Vurukonda *et al.*, 2018).

Nom du produit commercial	Microorganisme	Organisme nuisible / pathogène / maladie ciblée
Actinovate, Novozymes, BioAg Inc., USA	<i>Streptomyces lydicus</i> WYEC 108	Maladies du sol causées par <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Postia</i> , <i>Geotrichum</i> et <i>Sclerotinia</i>
Mycostop, Verdera Oy, Finland	<i>Streptomyces K61</i>	Atténuation causée par <i>Alternaria</i> et <i>R. solani</i> et <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora</i> et <i>Pythium</i> flétrissement et maladies des racines
Mykocide KIBC Co. Ltd. South Korea	<i>S. colombiensis</i>	Oïdium, moisissure grise, tache brune
Actofifit, Astur	<i>S. avermitilis</i>	Insecticide
Bactophil	<i>S. albus</i>	Maladies de germination des graines
Bialaphos	<i>S. hygrosopicus</i> , <i>S. viridochromogenes</i>	Herbicide
Incide SP, Sri Biotech Laboratories India Ltd., India	<i>S. atrovirens</i>	Insecticide
Actin, Sri Biotech Laboratories India Ltd., India	<i>S. atrovirens</i>	Fongicide

3.1.8.2. Actinomycète non-*Streptomyces*

Autres genres d'actinobactéries, tels que *Actinoplanes*, *Microbispora*, *Micromonospora* et *Streptosporangium* ont rarement été étudiés comme BCA et/ou comme promoteurs de croissance des plantes (PGP) (El Tarabily et Sivasithamparam, 2006).

Actinoplanes, *Saccharopolyspora* et *Micromonospora* sont le principal groupe d'actinomycètes qui produisent des métabolites importants sur le plan commercial avec des activités antimicrobiennes, antitumorales, insecticides, immunosuppressives et inhibitrices enzymatiques (Manivasagan *et al.*, 2013).

Micromonospora sont bien connues pour leur capacité à produire un grand nombre de cellulases, ces enzymes contribuent très probablement au renouvellement du matériel en décomposition dans différents habitats (De Menezes *et al.*, 2012).

Sabaou *et al.*, (1983) ont rapporté qu'une souche de *Nocardiosis dassonvillei* a montré des activités antimicrobienne, mycolytiques et parasitaires contre les hyphes végétatifs de *Fusarium oxysporum* et *F. albedinis*.

Il a été signalé que les spores d'*Actinoplanes* spp. ont une réponse chimiotactique à la présence des conidies fongiques, des chlamydospores et des sclérotés (Arora, 1986).

3.2. Les champignons

Certains champignons sont des parasites obligatoires qui nécessitent la croissance et la reproduction de l'hôte vivant, mais la majorité d'entre eux sont des saprophytes qui n'ont besoin d'aucun hôte et peuvent survivre dans le sol, l'eau ou l'air. La lutte biologique contre les agents phytopathogènes présents dans le sol au biais des champignons est un substitut potentiel à l'utilisation de pesticides chimiques, qui se sont déjà révélés nocifs pour l'environnement (Chet et Inbar, 1994 ; Singh *et al.*, 2018).

Le contrôle biologique fongique est un moyen passionnant et c'est un domaine de recherche ayant des implications sur la productivité végétale, la santé animale et humaine et la production alimentaire.

Selon Jyoti et Singh, (2016), l'attractivité des champignons en tant qu'agents de lutte biologique dépend à certaines propriétés :

- Leur omniprésence générale,

- Leur degré élevé de spécificité de l'hôte,
- La destruction de l'hôte,
- La persistance,
- L'efficacité de la dispersion,
- La facilité de culture en laboratoire.

3.2.1. *Trichoderma*

Trichoderma est un champignon filamenteux du sol qui fonctionne comme un agent de lutte biologique contre un large éventail d'agents pathogènes des plantes économiquement importants (**Brunner et al., 2005**).

Trichoderma a été largement utilisé pour la suppression des maladies. Il a la capacité de parasiter d'autres champignons, en raison de la production d'enzymes lytiques de la paroi cellulaire et de l'antibiose. De plus, il produit également divers métabolites secondaires et peut induire une résistance chez les plantes. Ces caractéristiques en font l'agent de lutte biologique le plus favorable à la protection des plantes (**Woo et al., 2014**).

Trichoderma spp. non seulement inhibe la croissance des agents pathogènes, mais profite également à la plante hôte en stimulant la colonisation de la rhizosphère, en favorisant la croissance des plantes et des racines et en améliorant les mécanismes de défense de la plante (**Khasa, 2017**).

3.2.2. *Beauveria*

Beauveria est un pathogène opportuniste et son utilisation contre de nombreux arthropodes est répandue. De nouvelles études explorant des méthodes alternatives de dissémination de ce champignon dans l'environnement ont été menées dans le but de maximiser l'efficacité de sa transmission aux arthropodes cibles (**Baron et al., 2019**).

Ce genre de champignon est également bien connue par la production de métabolites secondaires aux propriétés toxiques contre certains champignons phytopathogènes comme *Rhizoctonia solani* et *Pythium myriotylum* (**Ownley et al., 2008**).

3.2.3. *Fusarium*

Fusarium oxysporum est bien représenté dans la microflore de la rhizosphère. Bien que toutes les souches existent de manière saprophyte certaines sont pathogènes et peuvent induire la pourriture des racines (**Gerlach et Nirenberg, 1982 ; Olivain et Alabouvette, 1999**). Les

interactions entre les souches pathogènes et non pathogènes entraînent le contrôle de la maladie. Par conséquent, des souches non pathogènes sont développées en tant qu'agents de lutte biologique. Les souches non pathogènes de *F. oxysporum* présentent plusieurs modes d'action contribuant à leur capacité de lutte biologique. Ils sont en mesure de rivaliser pour les nutriments dans le sol, ce qui affecte le taux de germination des spores du pathogène. Ils peuvent également rivaliser pour les sites d'infection à la racine et déclencher des réactions de défense des plantes, induisant une résistance systémique (Fravel *et al.*, 2003).

3.2.4. Autres champignons

Bien qu'il existe une longue liste de champignons qui s'attaquent aux ravageurs de plantes, les plus importants sont *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Hirsutella*, *Nematophthora*, *Arthrobotrys*, *Drechmeria*, *Fusarium*, et *Monacrosporium*. *Verticillium chlamydosporium* serait également un champignon nématophage prometteur pour la gestion de certains nématodes à kystes et à nœuds racinaires (Bourne *et al.*, 1996).

Les levures Ascomycota se reproduisent exclusivement par bourgeonnement, comme la levure la plus connue *Saccharomyces cerevisiae*. Les basidiomycètes se développent de façon dimorphe, passant d'une forme de levure à une forme filamenteuse dikaryote (Choudhary et Johri, 2009).

C'est le cas de *Rhodotorula* et *Cryptococcus* sp. ces levures prospèrent apparemment de manière symbiotique ou mutualiste, colonisant virtuellement divers tissus végétaux (Doty, 2013), dans lesquels ils peuvent provoquer des changements structurels (Luna, 2017). Ils consomment des sucres et assimilent les acides aminés générés par la plante, et contribuent au bien-être et à la réponse au stress de la plante de différentes manières, y compris la production de hormones, de catalase ou de sidérophores (Joubert et Doty, 2018). Les levures peuvent antagoniser les champignons filamenteux phytopathogènes, soit en occupant leur niche, soit en les antagonisant. Par exemple, Suzzi *et al.*, (1995) ont observé que les souches naturelles de levure de vin de *Saccharomyces* et *Zygosaccharomyces* inhibaient *in vitro* la croissance de 10 espèces de champignons pathogènes d'origine végétale, à savoir *Cladosporium variable*, *Rhizoctonia fragariae*, *Phomopsis longicolla*, *Colletotrichum acutatum*, *Aspergillus niger*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Penicillium digitatum*, *Macrophomina phaseolina*, *Trichoderma viride*, et *Botrytis squamosa* (Ferraz *et al.*, 2019).

Chapitre 2. Les actinomycètes et les champignons filamenteux.

I. Les actinomycètes

1. Généralités

Le nom actinomycète dérive du grec ancien (actino aktís, « rayon ») et (mycetes múkēs, « champignon ») signifiant la formation de mycélium et la croissance axée sur l'extension de la pointe des hyphes. Les actinomycètes sont un groupe au sein du phylum Gram positif *Actinobacteria* contenant des genres de bactéries filamenteuses qui sont considérés comme un groupe de transition entre les bactéries et les champignons (Malviya *et al.*, 2013 ; Prudence *et al.*, 2020).

Les actinobactéries sont des bactéries à Gram positif, formant des spores, contenant environ 57 à 75 % de GC dans leur ADN. Les actinobactéries sont chimioorganotrophes qui se développent à pH neutre et aussi dans des conditions alcalophiles et acidophiles. Les actinobactéries peuvent être phototrophes, autotrophes ou hétérotrophe. Au cours de la croissance active, il y a un développement incomplet du mycélium chez les actinobactéries alors que les actinobactéries bien matures auront un mycélium de deux types ; l'un est rhizoïde dans le substrat et l'autre mycélium aérien sur le substrat extérieur (Segaran *et al.*, 2017).

La plupart des actinomycètes agissent comme des saprophytes pour la production de nutriments en dégradant les matières organiques qui sont connus pour être présents dans l'environnement comme les sédiments du sol, des étangs et des lacs (Segaran *et al.*, 2017).

Les actinomycètes ont été placées dans le phylum *Actinobacteria*, qui se compose actuellement de plus de 30 familles et plus de 160 genres. Étant un grand groupe de ressources microbiennes d'utilisation pratique étendue et de grande valeur commerciale, les actinomycètes contribuent à environ 70 % de la source d'antibiotiques et produisent également de nombreux métabolites bioactifs non antibiotiques, tels que des enzymes, des inhibiteurs d'enzymes, des régulateurs immunologiques, des propriétés antioxydantes, etc. Les actinomycètes sont largement distribués dans les habitats naturels, en particulier le sol et l'océan (Dilip *et al.*, 2013).

2. Morphologie des actinomycètes

Les actinomycètes présentent les plus grandes différences morphologiques parmi les bactéries Gram-positives ; cependant, la structure cellulaire des actinobactéries est typique des procaryotes et totalement différente des champignons. Les actinomycètes ont un mycélium radial bien développé. Selon la différence de la morphologie et de la fonction, le mycélium peut être divisé en mycélium de substrat et mycélium aérien. Les modes de croissance et de fracture du mycélium du substrat, la position de la spore, le nombre de spores, les structures de surface de la spore, la forme des sporanges et le fait que les sporangiospores aient ou non des flagelles sont toutes des caractéristiques morphologiques importantes de la classification des actinobactéries (Li *et al.*, 2016).

2.1. Mycélium de substrat

Le mycélium du substrat des actinobactéries varie en taille, forme et épaisseur. Sa couleur va du blanc ou pratiquement incolore au jaune, marron, rouge, rose, orange, vert ou noir (Anandan *et al.*, 2016). Les pigments les plus courants sont : les caroténoïdes (*Actinoplanes*, *Micromonospora*), les prodiogiosines (*Actinomadura*, *Streptomyces*), naphthochinones (*Streptomyces*, ex. protoactinorhodine), glycosides d'anthracycline (*Streptomyces*, ex. β -rhodomycine), phénazacinqones (*Streptomyces*, ex. actinomycine), diaza diphénocinqone (*Arthrobacter*, *Corynebacterium*, ex. nicotinblue), et diaza-indophénol (*Arthrobacter*, *Streptomyces*, ex. indochrom). De nombreux pigments sont des métabolites secondaires et leur production varie également au sein d'une même espèce (Wink *et al.*, 2017).

2.2. Mycélium aérien

Le mycélium aérien est généralement plus épais par rapport au mycélium du substrat. Le mycélium aérien montre un changement suffisant pour qu'un assortiment divers d'isolats puisse être séparé en un certain nombre de groupes ayant des caractéristiques morphologiques similaires dans des conditions fixes, comprenant la structure (cotonnée, veloutée ou poudreuse), la pigmentation et la formation d'anneaux ou de zones concentriques (Anandan *et al.*, 2016).

2.3. Morphologie de la chaîne de spores

La morphologie des spores est importante dans la taxonomie des actinobactéries. Les étapes initiales de sporulation chez plusieurs actinobactéries peuvent être considérées comme

des processus de bourgeonnement car elles satisfont aux principaux critères utilisés pour définir le bourgeonnement chez d'autres bactéries. Les spores peuvent se former sur le substrat et/ou le mycélium aérien sous forme de cellules individuelles ou en chaînes de différentes longueurs. Dans d'autres cas, les spores peuvent être hébergées dans des vésicules spéciales (sporangies) et dotées de flagelles (**Barka et al., 2016**).

Dans les genres *Thermoactinomyces*, *Micropolyspora* et *Micromonospora*, la formation de spores se produit directement sur le mycélium du substrat, alors que chez les *Streptomyces*, les spores se développent à partir du mycélium aérien. Les groupes *Actinosynnema* et *Actinoplanes* sont caractérisés par des spores mobiles, tandis que *Thermoactinomyces* possède des endospores uniques résistantes à la chaleur. Certains autres genres d'Actinobactéries ont des sclérotés (*Chainia*), des synnémés (*Actinosynnema*), des vésicules contenant des spores (*Frankia*) ou des vésicules dépourvues de spores (*Intrasporangium*). La figure 3 explique les différents types de spores que l'on peut trouver dans les genres actinomycètes (**Barka et al., 2016 ; Traxler et Rozen, 2022**).

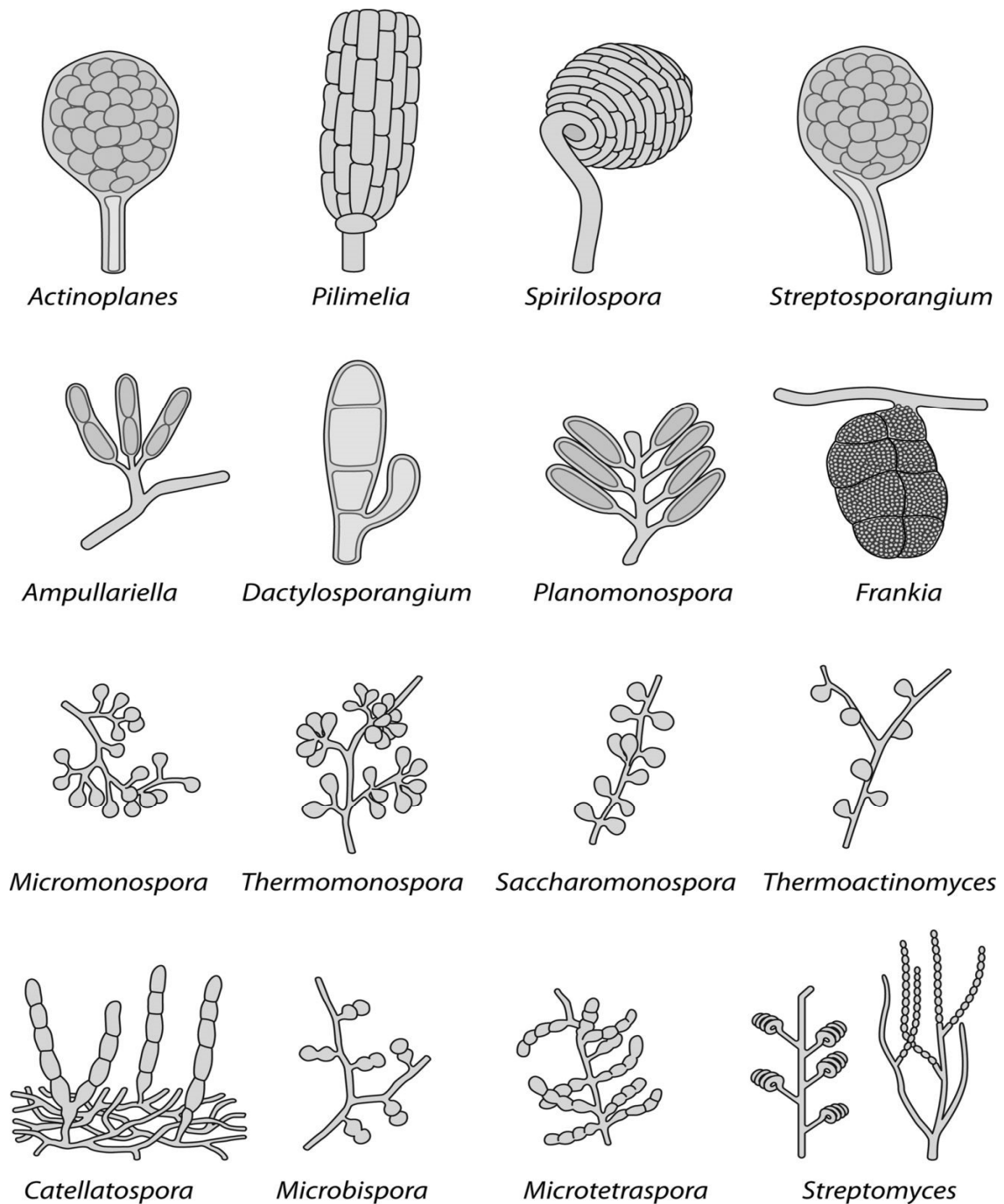


Figure 3. Morphologie des spores chez les actinomycètes (Barka *et al.*, 2016).

3. Cycle de vie

Ce sont des bactéries aérobies du sol omniprésentes avec un mode de vie filamenteux et se reproduisent par sporulation. Lorsque conditions sont favorables, une spore germe en formant une ou deux tubes germinatifs qui se développent en hyphes par extension et ramification de la pointe des hyphes, libérant ainsi des exoenzymes pour décomposer les polymères comme la chitine et la cellulose afin de fournir des nutriments (Van der Meij *et*

al., 2017). Lorsque les nutriments se raréfient, un programme de développement complexe visant la sporulation est lancé. Pour cela, le mycélium végétatif ou substrat subit une autolyse afin de fournir des nutriments au mycélium aérien. Les hyphes aériens reproducteurs subissent une réplication extensive de l'ADN et une division cellulaire pour former des chaînes de spores, chaque spore contenant un seul chromosome. L'initiation de la sporulation est liée à la production de métabolites secondaires bioactifs, tels que ceux ayant des activités antibiotiques, antifongiques, antivirales, antitumorales ou insecticides (Van der Meij *et al.*, 2017) (Figure 4).

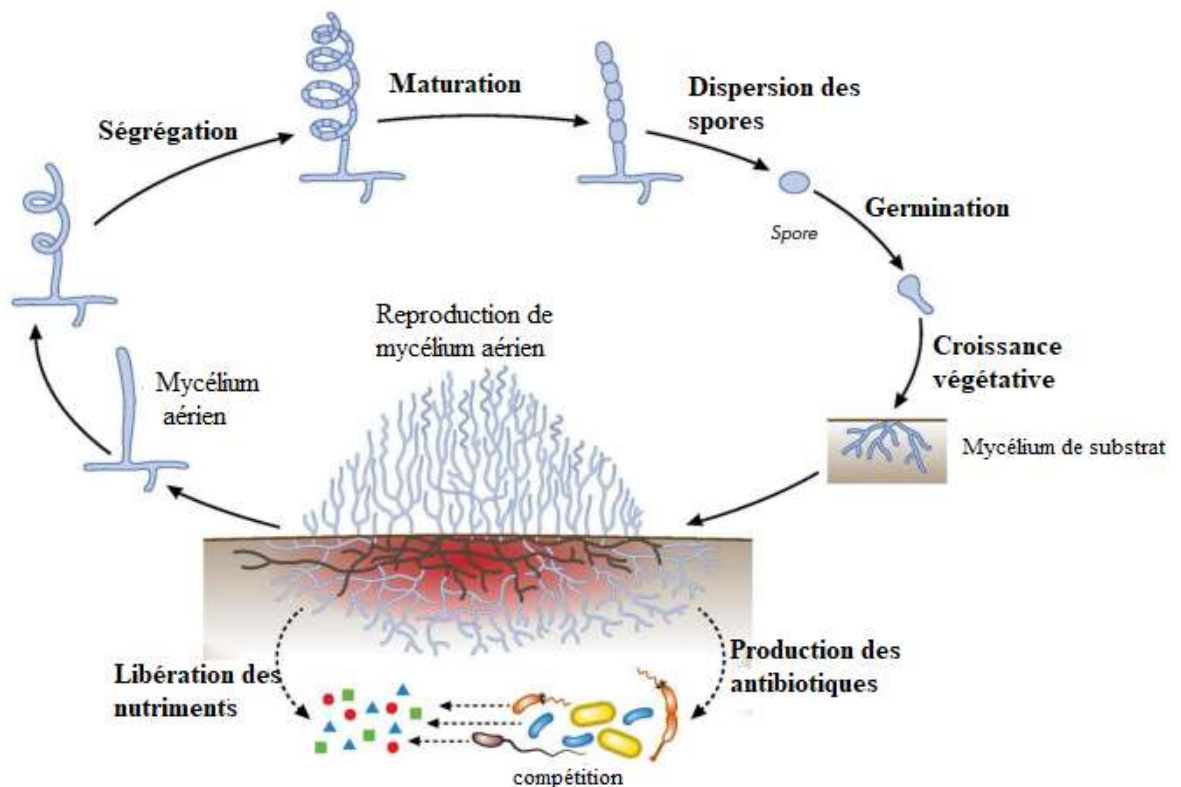


Figure 4. Cycle de vie des actinomycètes (Van der Meij *et al.*, 2017).

4. Classification des actinomycètes

Dans leur première systématique, les Actinobactéries appartenait à l'ordre des *Actinomycetales* et elles sont regroupées en 4 familles *Actinomycetaceae*, *Streptomyetaceae*, *Mycobacteriaceae* et *Actinoplanaceae*. La taxonomie des actinobactéries a considérablement évolué au fil du temps avec l'accumulation d'informations. Le phylum d'*Actinobacteria* est actuellement séparé en 6 classes : *Acidimicrobiia*, *Actinobacteria*, *Nitriliruptoria*, *Coriobacteriia*, *Thermoleophilia* et *Rubrobacteria*. La classe des *Actinobacteria* est subdivisée en 15 ordres (Gao et Gupta, 2012) qui sont regroupés dans la figure 5.

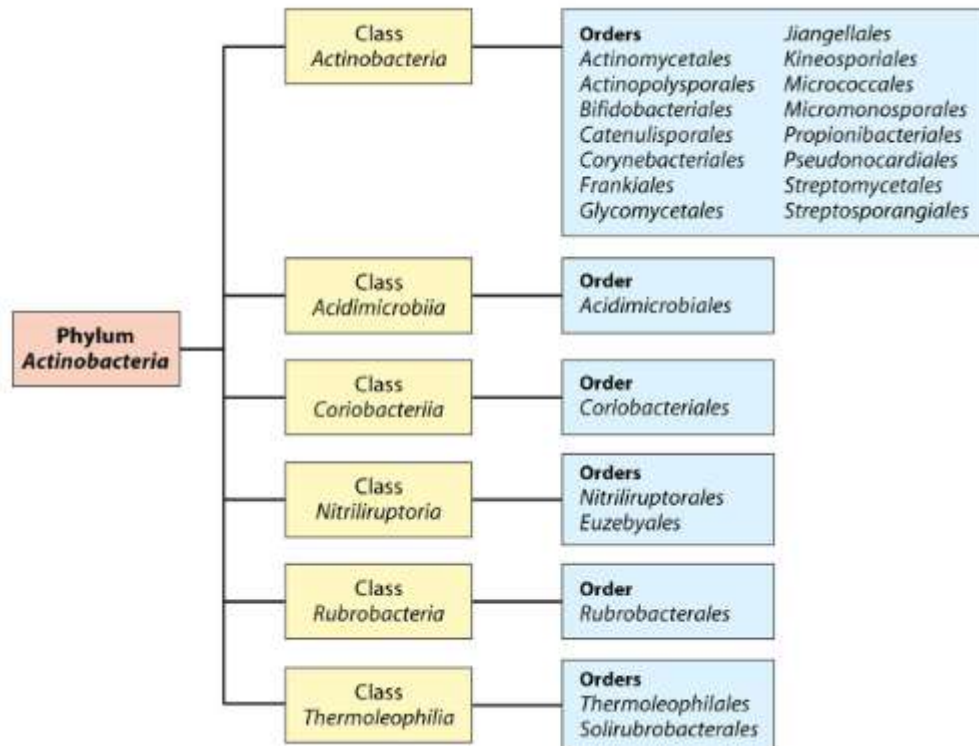


Figure 5. Systématique des actinomycètes (Gao et Gupta, 2012).

L'ère moderne de la classification des organismes proposés comme membres de la classe des Actinobactéries trouve son origine dans trois sources : premièrement, l'établissement de la chimiotaxonomie qui détecte les différences dans la composition chimique des constituants cellulaires tels que le peptidoglycane, les lipides polaires et les acides gras, les quinones isoprénoïdes, les cytochromes et la composition de base de l'ADN ; deuxièmement, l'introduction d'expériences de l'hybridation ADN-ADN qui mesurent les similitudes entre l'ADN simple brin de souches d'espèces étroitement apparentées ; et troisièmement, la détermination des similitudes de séquences d'ARNr et d'ADNr 16S, qui révèle l'étendue de la variation de séquence entre les souches à tous les niveaux de parenté (Stackebrandt *et al.*, 1997).

La dernière classification des actinomycètes mentionnée dans le « Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria » rapporte que le phylum *Actinobacteria* comprend 6 classes, 19 ordres, 50 familles et 221 genres. Cependant, de nombreux nouveaux taxons continuent d'être découverts, de sorte que cette liste est certainement inachevée. La classe des actinobactéries et les rangs taxonomiques fondamentaux au-dessus du niveau du genre ont été proposés exclusivement sur la base de séquençage de l'ARNr 16S. L'identification des

actinobactéries via des méthodes traditionnelles telles que les caractéristiques phénotypiques n'est pas aussi précise que les méthodes génotypiques. L'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S a été reconnue comme un outil puissant pour l'identification de souches mal décrites, rarement isolées ou phénotypiquement aberrantes et peut conduire à une analyse phylogénétique unique de souches nouvellement isolées (Amin *et al.*, 2020).

5. Distribution des actinomycètes

5.1.Le sol

La population d'actinomycètes est la plus importante dans la couche superficielle des sols et diminue progressivement avec la profondeur. Ils sont largement distribués dans le sol, le compost, etc, avec des valeurs estimées allant de 10^4 à 10^8 par gramme de sol. Ils sont sensibles à l'acidité/au pH bas (plage de pH optimale de 6,5 à 8,0) et conditions de sols gorgés d'eau. Ils sont mésophiles (25-30 °C) et certaines espèces couramment présentes dans le compost et les fumiers sont thermophiles et poussent à une température de 55 à 65 C (par ex. *Thermoactinomycètes*, *Streptomyces*) (Bhatti *et al.*, 2017).

La diversité des actinomycètes peut également être influencée par la gamme d'espèces végétales cultivées sur un sol particulier. Étant donné que différentes plantes produisent différents métabolites chimiques, afin de survivre, les actinomycètes doivent s'adapter à l'environnement. Le sol étant la meilleure source d'actinomycètes, de nombreuses recherches sont concentrées sur l'écologie du sol. Ils peuvent être trouvés dans une variété de sols, cultivés et non cultivés, fertiles et infertiles, dans diverses parties du monde (Devanshi *et al.*, 2021).

Il existe plusieurs groupes d'actinomycètes stables dans le sol et dans la rhizosphère des plantes. Les actinomycètes sont très importants pour de nombreuses plantes, où les streptomycètes rhizosphériques peuvent protéger les racines des plantes en inhibant la croissance des agents pathogènes fongiques, un caractère basé sur leur capacité à produire des antibiotiques antifongiques. En raison de leur diversité métabolique, les actinomycètes sont considérés comme une bonne source d'enzymes lytiques, d'antibiotiques et d'autres métabolites bioactifs (Selim *et al.*, 2021).

5.2.Habitat aquatique

Dans les résidus de marécages en bord de mer, les actinomycètes représentaient 2 à 5 % des groupes microbiens, et étaient une population indigène. Les actinomycètes poussent

également dans l'eau potable réservoir influençant la qualité de l'eau en provoquant des odeurs de terre, qui sont dues à leur génération de métabolites secondaires volatiles, comme la géosmine et le méthylisobornéol. La plupart des genres présents dans l'eau sont *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* et *Thermoactinomyces*. Un assortiment de genres a été isolé de l'eau de mer et sédiments marins sont *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Microbispora* et *Nocardia* (**Bawazir et Shantaram, 2018**).

5.3.Habitats extrêmes

Parmi les actinobactéries, celles qui sont halophiles ou halotolérantes suscitent l'intérêt tant du point de vue taxonomique que biotechnologique. Les écosystèmes extrêmes, peu ou pas exploités, représentent un domaine de recherche convoité où des espèces microbiennes rares ou nouvelles pouvant des potentiels de production intéressants sont ciblés (**Smati et kitouni, 2019**). Les conditions de vie auxquelles les actinobactéries marines ont dû s'adapter au cours de l'évolution des pressions extrêmement élevées (avec un maximum de 1100 atmosphères) et des conditions anaérobies à des températures juste en dessous de 0 °C sur la profondeur, à des conditions acides élevées (pH aussi bas que 2,8) et à des températures supérieures à 100 °C près des ouvertures hydrothermales des dorsales médio-océaniques. Il est probable que cela se reflète dans la diversité génétique et métabolique des actinomycètes marins, qui restent à exploiter (**Manivasagan et al., 2013**).

Les grottes volcaniques ont été peu concentrées pour leur potentiel en tant que sources de nouveaux composés bioactifs et d'espèces microbiennes avec de nouveaux échafaudages. La microbiologie des grottes volcaniques du Canada recommande que cet habitat spécifique possède un potentiel extraordinaire pour l'isolement de nouvelles substances secondaires bioactives. *Beutenbergia cavernae*, un nouveau genre d'actinomycètes et *Agromyces subbeticus* isolés de la grotte du sud de l'Espagne, où ces nouveaux isolats ont des activités antimicrobiennes contre une variété d'agents pathogènes résistants (**Selim et al., 2021**).

5.4.L'air

La capacité des spores d'actinomycètes à être dans l'air a été détectée là où l'air contient différents types de leurs spores. Il a été déclaré que les spores d'actinomycètes aéroportés comme *Nocardia* sp. sont fréquemment réponsues dans l'air (**Selim et al., 2021**).

Les spores aéroportées de plusieurs espèces d'actinomycètes (par exemple, *Saccharopolyspora rectivirgula*, *Micropolyspora faeni*, *Thermoactinomyces vulgaris* et *Streptomyces albus*) ont été associées à l'incidence d'alvéolite allergique et d'autres effets graves sur la santé (**Reponen et al., 1998**).

5.5. Insectes et oiseaux

Les insectes et les oiseaux deviennent des sources importantes pour trouver des composés bioactifs nouveaux chez les actinomycètes. Certains insectes, tels que *Pseudonocardia* et *Amycolatopsis*, tuent les mauvaises herbes en raison de leur capacité naturelle à produire des composés antimicrobiens grâce à une interaction symbiotique avec les actinomycètes. Les espèces de *Pseudonocardia* isolées à partir d'*Apterostigma dentigerum* produisent de la dentigerumycine, tandis que les espèces de *Streptomyces* isolées de genre *Acromyrmex* produisent de la candidicine, un antifongique bien connu. *Streptosporangium*, *Actinomadura*, *Saccharopolyspora*, *Thermoactinomyces* et *Nocardia* ont récemment été isolés à partir des nids des oiseaux et d'hirondelles (Ezeobiara *et al.*, 2022).

6. Importance des actinomycètes

Les actinobactéries produisent les deux tiers de tous les antibiotiques connus utilisés dans la clinique aujourd'hui, mais aussi une vaste gamme de composés anticancéreux, immunosuppresseurs, anthelminthiques, herbicides, pesticides, insecticides et des composés antiviraux, en plus des enzymes extracellulaires. Ces bactéries sont donc des attractives sources de molécules bioactives (Van Bergeijk *et al.*, 2020).

6.1. La production des antibiotiques

Les antibiotiques produits par les actinomycètes possèdent des structures chimiques les plus variées, qui présentent un large éventail d'activités biologiques (De Simeis et Serra, 2021). Il est rapporté que 45% des métabolites microbiens bioactifs actuellement connus étaient encore isolés de diverses espèces d'actinomycètes, et l'espèce *Streptomyces* produit 7600 composés (74% de tous les actinomycètes), tandis que les actinomycètes rares représentent 26%, au total 2500 composés (Singh *et al.*, 2014). En commençant par la découverte de l'actinomycine en 1940, ensuite l'apparition de streptothricine, streptomycine, chloramphénicol, les tétracyclines, les érythromycines, la néomycine, la novobiocine, oléandomycine, nystatine. La tendance se poursuit même au vingtième siècle avec l'ajout de nouveaux antibiotiques tels que daptomycine, épirubicine, analogues des carbapénèmes, théinamycine (Mahajan et Balachandran, 2012). Jusqu'à maintenant l'exploration de nouveaux habitats est l'une des plus prometteuses moyens d'isoler les actinomycètes producteurs d'antibiotiques doté d'une activité antimicrobienne (Charousová *et al.*, 2019).

6.2. Production des enzymes

Les actinomycètes ont une importance énorme car ils possèdent la capacité de produire et de sécréter une variété d'enzymes hydrolytiques extracellulaires (Janaki, 2017).

Les enzymes lignocellulolytiques, l'une des puissantes enzymes produites par les actinomycètes, peuvent être largement exploitées dans diverses industries. Les lignocellulases sont des enzymes hydrolytiques capables de dégrader la lignocellulose dure dans la biomasse végétale et comprennent les cellulases, les hémicellulases et laccase. Parmi les actinomycètes producteurs de cellulase et hémicellulase sont *Streptomyces* sp., *Cellulomonas fimi*, *Microbispora bispora* et *Thermobifida fusca* ont été largement étudiés. Les laccases sont trouvées chez *Streptomyces* sp., *Streptomyces cyaneus*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces ipomoea*, *Thermobifida fusca*, et *Streptomyces sviveus* (Saini et al., 2015).

Streptomyces spp. sont des producteurs prolifiques d'une enzyme commercialement importante, la xylanase. Xylanases de *Streptomyces* sp. sont préférés dans le traitement de la pulpe de paille de riz pour améliorer la blanchissabilité de la pulpe. Cette préférence est due à l'absence de contamination par la cellulase dans la xylanase et également à l'utilisation réduite de produits chimiques pendant le blanchiment et la réduction en pâte (Prakash et al., 2013).

Plusieurs études ont rapporté la production de protéases et de lipases à partir les Actinomycètes comme les membres des genres, *Streptomyces*, *Nocardia* et *Nocardiopsis*. La plupart des protéases montrent une tolérance à divers stress abiotiques tels que le pH, la température et la salinité élevés (Mehnaz et al., 2017).

Les enzymes amylases, qui sont considérées comme un produit potentiel dans de nombreux domaines, notamment les industries de fabrication, clinique, médicinale, de chimie analytique, de production d'éthanol, de textile, d'alimentation, de brasserie et de distillation dont les actinomycètes sont parmi les premiers producteurs de l'amylase à savoir les genres *Streptomyces* sp., *S. avermitilis*, *S. fragilis*, *Nocardiopsis* sp. et *Thermobifida* sp. (Al-Agamy et al., 2021).

Les chitinases sont spécifiques pour dégrader des polymères linéaires de N-acétylglucosamine. Les chitinases ont été isolées à partir de filtrats de culture de *S. griseus*, *S. antibiotiques*, *Amycolatopsis (Streptomyces) orientalis*, et de plusieurs souches de *Streptomyces* spp. (Vaijyanthi et al., 2016). L'industrie alimentaire utilise les pectinases notamment dans la clarification des jus de fruits, le dégomme des fibres, la vinification et le rouissage des fibres libériennes. Pectinases de *Streptomyces* sp. et *Nocardia* sp. sont largement étudiés (Salehghamari et al., 2019).

Un éventail d'autres enzymes à potentiel industriel signalées par les actinomycètes comprend les peroxydases, thrombinase, L-asparaginase, galacturonase, glucanase et les

tyrosinases qui sont efficaces dans le traitement des colorants textiles promettant leur application dans les usines de traitement des déchets (**Prakash et al., 2013**).

La production des enzymes est impliquée dans la bioremédiation en utilisant d'organismes et/ou de leurs produits métaboliques pour éliminer, réduire ou transformer les contaminants en espèces moins nocives pour l'environnement dont le genre *Streptomyces* et non-*Streptomyces* tel que *Gordonia*, *Nocardioïdes*, *Frankia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, et *Arthrobacter* sont largement utilisés dans ce processus (**Romano-Armada et al., 2020**).

6.3. Production des molécules de contrôles des ravageurs de plantes

Outre les quantités énormes de métabolites agro-actifs produits par les actinomycètes, ils jouent également un rôle important dans l'agriculture en tant qu'agents de lutte biologique. *Streptomyces hygroscopicus var. geldanus*, un producteur de geldanamycine, dans le sol pour sa capacité à contrôler la pourriture des racines du pois causé par *Rhizoctonia*. *Streptomyces violaceusniger YCED9*, producteur de nigéricine, de geldanamycine et d'un complexe d'antibiotiques lactones macrocycliques, dans des expériences en serre pour contrôler *Rhizoctonia solani* et *Sclerotinia homeocarpa* (**González-Franco et Robles-Hernández, 2009**).

Les avermectines polycétides et les milbémycines sont les principales classes de pesticides macrolides. Ces composés possèdent un large spectre antiparasitaire puissant à faible dose et sont actifs contre de nombreux nématodes immatures. Les milbémycines, produites à partir de cultures de *Streptomyces hygroscopicus* ou *Streptomyces bingchengensis*, sont structurellement similaire aux avermectines (**Li et al., 2021**). Les composés actifs isolés de *Streptomyces* ont montré des activités régulatrices de la croissance des insectes et insecticides contre *Aedes albopictus* et *Plutella xylostella*. Les prasinons, l'avermectine le doramectine, la milbémycine, la nanchangmycine, le spinosad et la dianemycine ont été dérivés en tant que composés actifs du genre *Streptomyces* spp., Contre une variété d'insectes nuisibles (**Kim et al., 2022**).

Les actinomycètes sont un groupe important de micro-organismes produisant de nombreux composés actifs d'herbicides tels que l'anisomycine, le bialaphos et l'herbicide A et B contre *Parthenium hysterophorus*, *Ageratum conyzoides* et *Bidens biternata*. L'utilisation de métabolites secondaires microbiens comme herbicide naturel potentiel sert de modèle pour les produits agrochimiques bio-rationnels et respectueux de l'environnement, qui ont été mis en évidence pour une approche holistique dans la gestion intégrée des mauvaises herbes (**Singh et al., 2018**).

II. Les champignons filamenteux

1. Généralités sur les champignons

Les champignons (moisissures et levures) sont des types particuliers de micro-organismes abondants et répandus dans la nature. En général, les champignons sont connus comme des décomposeurs et aussi des parasites des animaux et des plantes. Contrairement à d'autres microbes, les champignons n'ont pas la capacité de produire leur propre nourriture car ils sont dépourvus de chlorophylle. Pour maintenir leur existence, les champignons se nourrissent soit de plantes et d'animaux vivants (hôte vivant), soit de plantes et d'animaux morts et en décomposition. Les champignons sécrètent des enzymes extracellulaires qui peuvent décomposer les composés organiques complexes en composés monomères assimilables. Ces composés simples sont finalement utilisés par les champignons comme sources d'énergie, de carbone et d'autres nutriments (Sugiharto, 2019).

Les levures sont des champignons qui se développent en cellules solitaires qui se reproduisent par bourgeonnement. Les taxons de levure se distinguent sur la base de la présence ou de l'absence de capsules, de la taille et de la forme des cellules de levure. La morphologie est principalement utilisée pour distinguer les levures au niveau du genre, tandis que la capacité d'assimiler et de fermenter diverses sources de carbone et d'utiliser le nitrate comme source d'azote est utilisée conjointement avec la morphologie pour identifier les espèces (McGinnis et Tyring, 1996).

Les champignons filamenteux sont également classés comme un royaume et séparés des plantes, des animaux et des bactéries. Avec des parois cellulaires contenant de la chitine ; une caractérisation principale par rapport aux parois cellulaires végétales qui contiennent de la cellulose et des parois cellulaires bactériennes, les champignons sont abondants dans l'environnement et discrets en raison de leurs petites structures et de leurs modes de vie cryptiques sur les substrats qu'ils habitent (Egbuta *et al.*, 2016).

2. Morphologie des champignons filamenteux

Les moisissures sont caractérisées par le développement d'hyphes, qui donnent les caractéristiques de colonies observées en laboratoire. Les hyphes s'allongent par un processus connu sous le nom d'élongation apicale, qui nécessite un équilibre prudent entre la lyse de la paroi cellulaire et la nouvelle synthèse de la paroi cellulaire. Certaines moisissures produisent des cellules spéciales en forme de sac appelées sporanges, dont tout le protoplasme se divise

en spores appelées sporangiospores. Les sporanges sont généralement formés sur des hyphes spéciaux appelés sporangiophores (McGinnis et Tying, 1996) (Figure 6).

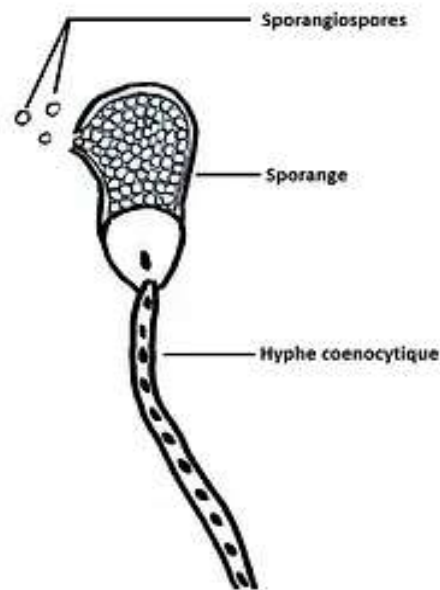


Figure 6. Structure et morphologie de moisissure (site web3 : <https://moisissures.wixsite.com/tpemoisissures/blank-c13ay>).

La classification et l'identification des champignons, contrairement à d'autres agents pathogènes importants tels que les bactéries ou les virus, reposent principalement sur des critères morphologiques. Les champignons d'importance médicale sont microscopiques, et l'étude de leur morphologie nécessite l'utilisation du microscope optique (Guarro et al., 1999).

Un champignon typique est constitué d'une masse de filaments ramifiés et tubulaires entourés d'une paroi cellulaire rigide. Les filaments, appelés hyphes (au singulier hypha), se ramifient de manière répétée en un réseau compliqué, s'étendant radialement, appelé mycélium, qui constitue le thalle, ou corps indifférencié, du champignon typique. Le mycélium se développe en utilisant les nutriments de l'environnement et, lorsqu'il atteint un certain stade de maturité, il forme - soit directement, soit dans des fructifications spéciales - des cellules reproductrices appelées spores. Les spores sont libérées et dispersées par une grande variété de mécanismes passifs ou actifs ; lorsqu'elles atteignent un substrat approprié, les spores germent et développent des hyphes qui se développent, se ramifient à plusieurs reprises et deviennent le mycélium du nouvel individu. La croissance fongique est

principalement confinée aux extrémités des hyphes, et toutes les structures fongiques sont donc constituées d'hyphes ou de portions d'hyphes (Moore *et al.*, 2020).

Dans la croissance des champignons filamenteux, diverses formes peuvent être reconnues. Le modèle commun de croissance des champignons filamenteux provient d'un hyphe qui forme un réseau entrecroisé, que nous appelons mycélium. Enfin, les pastilles sont des agrégats d'hyphes compacts fortement entrelacés, sphériques ou semi-sphériques (Figure 7). De plus, le terme « touffe » est souvent utilisé pour décrire de petits agrégats de mycélium ou de grandes et lourdes masses de mycélium agrégé (Reyes *et al.*, 2017).

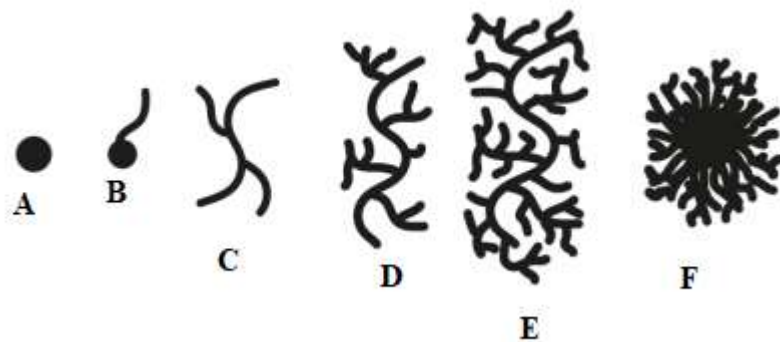


Figure 7. Formation d'un culot fongique à partir d'une spore (A : spore, B : tube germinatif, C : hyphe, D : hyphe bronchique, E : agglomérat d'éléments hyphes, F : Pastille) (Reyes *et al.*, 2017).

2.1. Spore fongique

La spore fongique peut être considérée comme le début et la fin du développement d'un champignon. Lorsqu'elle est placée dans un environnement approprié, la spore fongique germe et à partir de là, la cellule germée se développe et s'étend pour former un fil semblable à une cellule, appelé hyphe (Pazouki et Panda, 2000).

Il existe deux formes de spores qui peuvent être sexuelles ou asexuelles :

2.1.1. Spores asexuelles

Les spores asexuées se forment après la mitose (mitospore) sans participation de la méiose. Les champignons produisent une énorme variété de spores asexuées. Certaines espèces peuvent produire plusieurs types de ces spores. Par exemple, *F. oxysporum* forme des macrospores en forme de banane, des microspores plus petites et des chlamydospores à parois

épaisses. Le rapport entre la formation de macro- et de microspores dépend des conditions environnementales et de l'espèce (Wyatt *et al.*, 2013).

2.1.2. Spores sexuelles

Le développement sexuel augmente la diversité génétique et favorise la survie dans un environnement changeant. Le développement sexuel se produit largement dans le règne fongique et les spores qui en résultent portent de nombreux noms différents. Les zygospores sont les spores sexuées produites par Zygomycota dans les zygosporanges. Les zoospores diploïdes mobiles sont le résultat de la reproduction sexuée complexe de Chytridiomycota, tandis que les basidiospores de Basidiomycota et les ascospores d'Ascomycota sont produites sur les basides et dans les asques, respectivement (Wyatt *et al.*, 2013).

3. Classification des champignons

La classification adoptée actuellement utilise une hiérarchie linnéenne telle que modifiée par le Code international de nomenclature botanique (Code) (McNeill *et al.*, 2006), et utilise sept rangs, dont : ordre (suffixe : -ales), sous-classe (-mycetidae), classe (-mycètes), sous-embranchement (-mycotina), embranchement (-mycota), sous-royaume et royaume. Les taxons placés au même rang ne sont pas nécessairement équivalents en âge (sauf taxons frères), en nombre d'espèces ou en degré de divergence morphologique (Hibbett *et al.*, 2007).

Selon le dictionnaire des champignons d'Ainsworth et Bisby, 10e éd. (2008), la classification phylogénétique des champignons divise le royaume en 7 embranchements, 10 sous-embranchements, 35 classes, 12 sous-classes et 129 ordres.

Un grand nombre de champignons filamenteux connus ont tendance à provenir du sous-embranchement « Pezizomycotina » qui relève du Phylum « Ascomycota », faisant également partie du sous-royaume Dikarya. Comme indiqué dans le graphique de la **Figure 8**, les champignons filamenteux englobent de nombreux genres de champignons y compris *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Emericella*, *Eurotium*, *Curvularia*, etc (Egbuta *et al.*, 2016).

Cependant, il est généralement admis, sur la base des données moléculaires disponibles, que les Dikarya sont composés de deux groupes, les Ascomycota et Basidiomycota. Ces deux groupes, qui comprennent des organismes essentiels à l'industrie tels que la levure de boulangerie et la levure de bière, ainsi que de nombreux agents pathogènes importants pour

l'agriculture tels que les rouilles (causés par les espèces de Pucciniomycotina) et la maladie de charbon commun (causée par les espèces de Ustilaginomycotina), sont potentiellement les plus étudiés parmi les champignons (Ebersberger *et al.*, 2012).

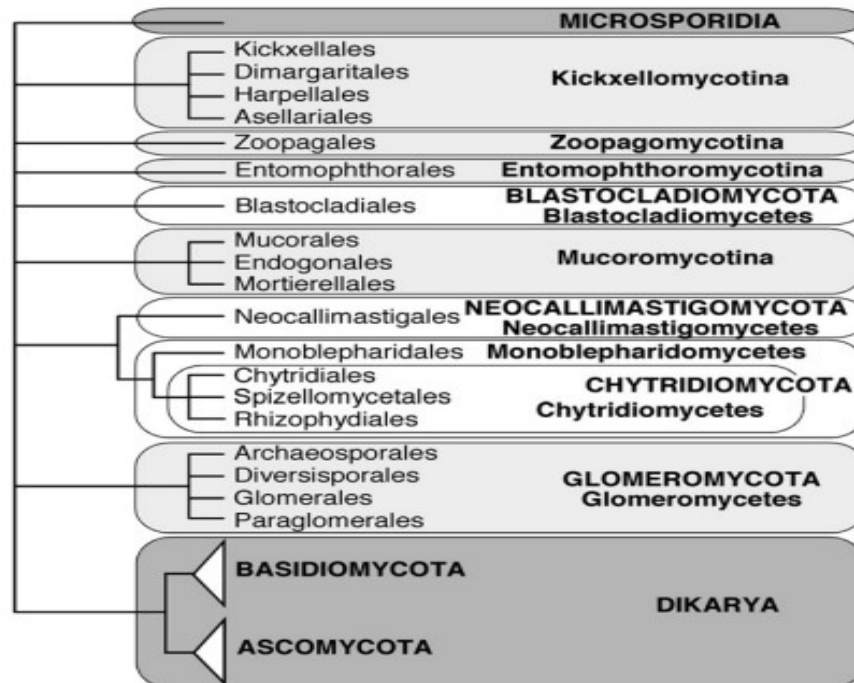


Figure 8. Phylogénie et classification des champignons (Hibbett *et al.*, 2007).

3.1. Ascomycota

Le phylum Ascomycota ou champignon sac contient une variété d'organismes, notamment des pathogènes de plantes, d'insectes et de mammifères, ainsi que des levures unicellulaires, des saprotrophes et des symbiotes mutualistes. Ces champignons forment des spores méiotiques appelées ascospores enfermées dans un sac spécial appelé ascus (Morrow et Fraser, 2009).

L'ascomycète est le plus grand phylum des champignons. Il comprend près de 50 % de toutes les espèces fongiques connues et environ 80% des espèces pathogènes et opportunistes. La caractéristique fondamentale qui différencie les ascomycètes des autres champignons est la présence d'asques (Guarro *et al.*, 1999).

Cependant, même en l'absence de cette importante caractéristique, les ascomycètes peuvent être reconnus par leurs parois hyphales bicouches avec une fine couche externe dense en électrons et une couche interne relativement transparente en électrons (Guarro *et al.*, 1999).

Les Ascomycètes saprophytes sont ceux qui tirent leurs ressources de la dégradation de la matière organique morte.

Selon Naranio-Ortiz et Gabaldon, (2019) ce phylum contient trois sous-embranchements principales : Taphrinomycotina, Saccharomycotina et Pezizomycotina.

3.1.1. Taphrinomycotina

Ce dernier contient cinq classes : Schizosaccharomycètes, Pneumocystidiomycètes, Neoelectomycètes, Taphrinomycètes, et Archaeorhizomycètes. La classe des Schizosaccharomycetes contient seulement trois espèces de levures. Les levures à fission se divisent par la formation d'un septum au milieu de la cellule. Cette levure est un saprotrophe qui se développe sur des aliments riches en sucre. Pneumocystidiomycetes sont des pathogènes opportunistes de l'homme et provoquent des pneumonies chez les patients dont le système immunitaire est endommagé. Les espèces de Neoelecta (Neoelectomycetes) sont les seuls membres de ce subphylum qui produisent un corps fruitier macroscopique : les autres espèces sont des levures, bien que les Taphrinomycetes, parasites des plantes, forment également des colonies d'hyphes se développant en pointe dans leurs plantes hôtes. Les Archaeorhizomycetes ont été décrits en 2011 comme un assemblage de centaines d'espèces de champignons filamenteux dont l'ADNr a été amplifié à partir d'échantillons de sol. Ces ascomycètes sont associés aux racines sans former de structures mycorhiziennes ou endophytiques typiques (Money, 2016).

3.1.2. Saccharomycotina

Ce sous-embranchement contient une seule classe (Saccharomycetes), et est composée principalement de levures qui ont des asques nus, ne forment pas de corps fructifères, et se reproduisent asexuellement par bourgeonnement (Gabaldón *et al.*, 2016).

Saccharomycotina est une lignée de plus de 1000 espèces connues, communément appelée levures bourgeonnantes. Les espèces de cette lignée comprennent l'organisme modèle *Saccharomyces cerevisiae* et plusieurs pathogènes notables, tels que le pathogène humain opportuniste *Candida albicans* et le pathogène émergent multirésistant *Candida auris* (Shen *et al.*, 2020).

3.1.3. Pezizomycotina

Ce sous-embranchement comprend des saprotrophes qui se développent sur les tissus végétaux, et sur les excréments des herbivores, des parasites des plantes et des animaux, et des partenaires dans les symbioses lichéniques et mycorhiziennes. Ces champignons sont omniprésents dans les habitats forestiers où leurs colonies noircissent le bois et leurs stromas

se développent comme des projections en forme de doigts (**Money, 2016**). Les ascomycètes comprennent des espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* dont les phases conidiennes sont cruciales dans les applications biotechnologiques, notamment la fermentation et la production alimentaire, ainsi que la production d'enzymes et d'antibiotiques. Les ascomycètes comprennent de nombreux pathogènes importants des plantes, y compris des espèces de *Pleospora*, *Cochliobolus*, *Venturia* et *Cladosporium*. Les espèces d'*Alternaria* sont des saprotrophes et pathogènes des plantes, dont les conidies abondantes en suspension dans l'air contribuent de manière significative à l'asthme. Les stades sexués ne sont pas connus chez ces champignons. *Sporormiella* est un autre ascomycète qui produit des asques. Les espèces de *Sporormiella* se développent sur les excréments d'herbivores (**Money, 2016**).

3.2. Basidiomycota

Le phylum Basidiomycota peut être divisé en grandes lignées : les champignons et les rouilles. La tentative la plus récente de classification phylogénétique basée sur les données moléculaires disponibles a abouti à la formation de trois sous-phyla : Agaricomycotina (champignons), Pucciniomycotina (rouilles) et Ustilaginomycotina (champignons), bien que l'ordre d'émergence dans l'histoire de l'évolution ne soit pas clair (**Elbersberger et al., 2012**).

Chez de nombreux Basidiomycota, l'état dikaryotique est maintenu par des connexions clampées qui aident à rétablir les paires de noyaux compatibles après des divisions mitotiques synchrones. Périodiquement, les dikaryons de longue durée produisent des cellules terminales généralement en forme de club, les éponymes, les basides. C'est là que la caryogamie se produit, donnant naissance à la cellule diploïde. Peu de temps après, la méiose se produit et les quatre noyaux résultants migrent dans quatre cellules apicales généralement externes, les basidiospores. Bien que les basides soient microscopiques, elles peuvent être produites sur ou dans de grandes spores multicellulaires porteuses de spores (c'est-à-dire des basidiocarpes) (**Wallen et Perlin, 2018**).

3.2.1. Chytridiomycota

Les Chytridiomycota, communément appelés chytrides, sont un groupe d'organismes vivant principalement dans l'eau, bien que certains sont des agents pathogènes des plantes. Dans les environnements aquatiques, ils forment des filaments peu abondants avec des sporanges (**Volk, 2003**).

Les Chytridiomycota se reproduisent avec des zoospores qui sont capables de se déplacer activement dans les phases aqueuses. Pour la plupart des membres des Chytridiomycota, la reproduction asexuée se fait par la libération de ces zoospores dérivées par mitose. Chez certains membres, la reproduction sexuée s'effectue par la fusion d'isogamètes. Les Chytridiomycota sont coenocytiques, sans distinction entre les cellules individuelles. Les filaments sont longs et tubulaires avec un revêtement de cytoplasme et une grande vacuole au centre. Ces organismes unicellulaires possèdent des hyphes ramifiés avec des rhizoïdes (McConnaughey, 2014) (Figure 9).

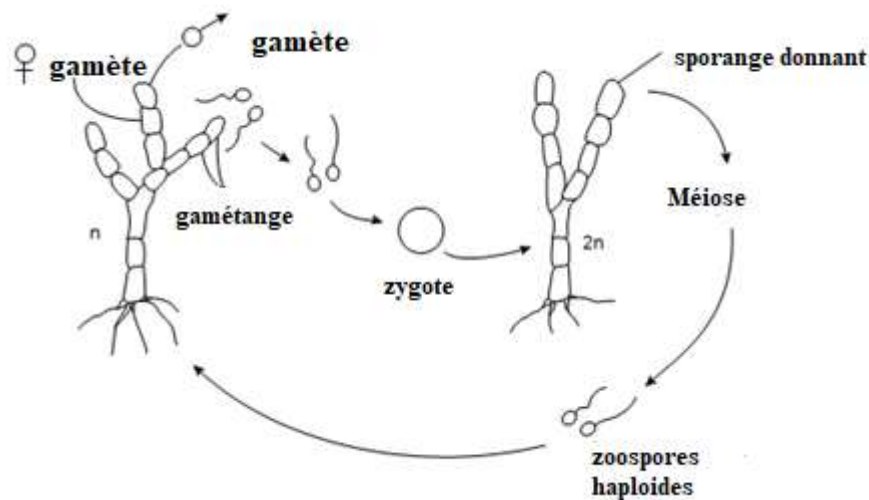


Figure 9. La reproduction chez les *Chytridiomycètes* (site web4 : <http://www.expertsmind.com/topic/reproduction-in-fungi/reproduction-in-the-chytridiomycota-92582.aspx>).

3.2.2. Glomeromycota

Les membres du Glomeromycota forment des associations mutualistes, appelées endomycorhizes, avec les racines d'environ 70% des plantes de la planète. Ces endomycorhizes sont également connues sous le nom de champignons mycorhiziens à arbuscules. Les Glomeromycota forment des spores asexuées relativement grandes dans le sol, mais la reproduction sexuée est inconnue (Volk, 2003).

Les Gloméromycètes forment un type de symbiose où les hyphes fongiques envahissent les cellules des racines des plantes et où les deux espèces bénéficient de l'apport accru de nutriments. Le symbiote fongique reçoit des hydrates de carbone de la plante en échange de son rôle de système racinaire étendu, ce qui améliore considérablement l'absorption des

minéraux par les racines de la plante. Les Glomeromycota se reproduisent de manière asexuée par le développement blastique des extrémités des hyphes pour produire des spores relativement grandes avec des parois en couches, contenant plusieurs centaines à des milliers de noyaux (McConnaughey, 2014).

3.2.3. Blastocladiomycota

Les Blastocladiomycota sont des champignons aquatiques qui produisent des zoospores flagellées. Les Blastocladiomycota vivent dans des habitats d'eau douce, dans la boue et dans le sol, où ils agissent en tant que saprotrophes, décomposant la matière organique, les débris végétaux et animaux, ou parasitant les arthropodes. Moins de 200 espèces ont été décrites. Les espèces d'*Allomyces* sont des saprotrophes qui forment des colonies haploïdes et diploïdes séparées avec une morphologie inhabituelle (Money, 2016).

Les zoospores de *Blastocladiella emersonii* ont une structure très similaire à celles d'*Allomyces*, mais ce champignon produit un thalle ovoïde plutôt que la colonie plus étendue d'hyphes ramifiés caractéristique d'*Allomyces*. La limitation des nutriments déclenche la transformation du thalle en un sporange à partir duquel les zoospores sont déversées dans l'eau. Les espèces d'un troisième genre dans le Blastocladiomycota, *Coelomomyces*, sont des parasites d'arthropodes. *Coelomomyce psorophorae* a un cycle de vie compliqué, qui rappelle la biologie de certaines rouilles, et qui implique l'infection des larves de moustiques (Money, 2016).

3.2.4. Neocallimastigomycota

Le phylum Neocallimastigomycota contient huit genres (environ 20 espèces) de champignons strictement anaérobies. Les relations évolutives de ces genres sont incertaines en raison de l'insuffisance des données de séquences pour déduire leurs phylogénies (Wang *et al.*, 2017).

Les 20 espèces de cet embranchement hautement spécialisé sont des champignons anaérobies qui se développent dans le tube digestif des herbivores. Leur métabolisme est alimenté par la décomposition des polysaccharides présents dans les fibres du régime alimentaire de l'hôte pour produire des sucres : les Neocallimastigomycota sont fibrolytiques (Money, 2016).

Ces champignons sont dépourvus de mitochondries. En l'absence d'oxygène, l'oxydation du pyruvate est catalysée par la pyruvate:ferredoxine oxydoréductase dans les hydrogénosomes avec un don d'électrons à une [Fe]-hydrogénase qui produit de l'hydrogène. Les zoospores uniflagellées sont produites par ces champignons, des spores multi-flagellées sont également décrites chez certaines espèces (Money, 2016).

3.2.5. Microsporidies

Les Microsporidies sont des parasites intracellulaires obligatoires, formant des spores, qui envahissent les vertébrés et les invertébrés. Une caractéristique des Microsporidies est le tube polaire ou le filament polaire que l'on trouve dans la spore et qui sert à infiltrer les cellules hôtes. Ces parasites eucaryotes infectent principalement les arthropodes et les poissons, mais ont gagné en notoriété au cours des dernières décennies en raison de leur infection accrue chez les humains immunodéprimés. Les Microsporidies produisent des spores très résistantes qui peuvent survivre hors de l'hôte pendant plusieurs années. Les spores sont généralement de forme ovale, mais peuvent être en forme de bâtonnets ou sphériques, et sont transmises par l'hôte lorsqu'il les ingère à partir de l'environnement (Han et Weiss, 2017).

4. Distribution des moisissures dans la nature

En raison de leur nature omniprésente, les champignons filamenteux sont largement répandus dans l'environnement. La grande variété de substrats sur lesquels les champignons filamenteux sont capables de se développer a également contribué à leur large diffusion dans l'environnement mondial (Pitt et Hocking, 1997).

4.1. L'air

Les champignons filamenteux sont largement distribués dans l'air. Ils ont été isolés à partir d'échantillons d'air prélevés dans différentes zones telles que les hôpitaux, les espaces extérieurs et les ménages. Parmi les nombreuses espèces de champignons filamenteux, les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Cladosporium* ont été pour la plupart isolés avec une moindre occurrence de *Fusarium* et d'autres espèces. Au sein du genre *Aspergillus*, *A. flavus*, *A. niger* et *A. fumigatus* sont les espèces les plus communes isolées à partir d'échantillons d'air prélevés (Panagoulou *et al.*, 2007 ; Khan et Karuppaiyil, 2012).

De nombreux champignons peuvent être isolés de l'air, leur incidence variant en fonction de facteurs géographiques, environnementaux ou bioclimatiques tels que le site de collecte, la

période de l'année, l'humidité relative de l'air, les précipitations, la vitesse du vent où ils ont été produits. Par conséquent, ces facteurs déterminent la qualité et la quantité du mycobiote existant dans les écosystèmes (Migahed, 2003).

4.2. Le sol

Les champignons filamenteux constituent une partie importante de l'écosystème du sol, jouant un rôle central dans les interactions biotiques et abiotiques dans cet environnement, participant à la décomposition de la matière organique et au recyclage des nutriments du sol pour les rendre disponibles aux plantes. Par conséquent, les communautés de champignons du sol sont impliquées dans la fertilité des sols et contribuent à l'atténuation de la dégradation des sols (Rosas-Medina *et al.*, 2020).

Les champignons du sol sont un groupe d'organismes extrêmement diversifié. Une étude récente sur la diversité des champignons du sol a révélé environ 80500 unités taxonomiques opérationnelles présentes dans les sols du monde entier. La diversité fongique du sol est affectée par les conditions environnementales locales, y compris les caractéristiques chimiques et physiques du sol, qui déterminent dans une large mesure la composition des communautés fongiques existantes (Rosas-Medina *et al.*, 2020).

Les moisissures sont une composante importante du microbiote du sol, constituant généralement plus de biomasse du sol que les bactéries, selon la profondeur du sol et les conditions nutritionnelles. Les moisissures jouent un rôle crucial dans la décomposition des polymères structuraux végétaux, tels que la cellulose, l'hémicellulose et la lignine, contribuant ainsi au maintien du cycle global du carbone (Devi *et al.*, 2012).

Acremonium, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, et *Trichoderma* sont des genres largement présents dans le sol (Egbuta *et al.*, 2016)

4.3. L'eau

Une gamme de genres de champignons filamenteux ont été isolés à partir de différentes sources d'eau. Ces sources comprennent les rivières, les eaux souterraines, l'eau de la mer morte, l'eau du robinet et eau en bouteille (Egbuta *et al.*, 2016).

Certains champignons sont principalement adaptés aux milieux aquatiques et seront donc naturellement présents dans l'eau. Ces champignons sont zoosporiques et beaucoup appartiennent aux phylums Chytridiomycota. Ces champignons ont la capacité de se

développer attachés à un substrat, faisant partie de biofilms microbiens sur les surfaces des tuyaux, les débris ou les sédiments. Ils sont susceptibles de s'établir là où il y a des fissures, des piqûres ou des impasses (Hageskal *et al.*, 2009).

5. Avantages des moisissures

Les champignons filamenteux produisent une multitude de métabolites bioactifs, dont beaucoup sont considérés comme importants du point de vue humain. Parmi eux, des composés toxiques sont produits naturellement, tels que des mycotoxines, des agents cytotoxiques et des cancérigènes, ainsi que des molécules potentiellement utiles, notamment des antibiotiques, des enzymes, des fongicides, des insecticides et des agents antiviraux (Tableau 2) (Krain et Siupka, 2021).

Tableau 2. Différents types de produits fongiques filamenteux d'importance industrielle (El-Enshasy, 2007).

Produit	Microorganismes
Antibiotiques Penicillines G et V Cephalosporine C Griseofulvine Penicilline N Pleuromutiline Cyclosporine A Cyclosporine A et B	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Cephalosporium acremonium</i> <i>Penicillium patulum</i> <i>Emericellopsis</i> sp. <i>Pleurotus mutilus</i> <i>Tolepocladium inflatum</i> <i>Cylinrocarpum lucidum</i>
Enzymes Glucose oxidase, pectinase et phytase Xylanase et invertase. Amylase et glucoamylase Cellulase et hemicellulase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus awamori</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Trichoderma reesei</i>
Mycotoxines Aflatoxins, citrinine et ochratoxine. Trichothecenes et zearalanone. Citrinine, ochratoxine.	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Penicillium</i> sp.
Autres produits fongiques indigènes Riboflavine Acide citrique et gluconique Acide kojique et biotine Acide itaconique Pullulane Biotine Ergot alkaloïde Acide gibberellique Acide linoléique	<i>Ashbya gossypii</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Claviceps purpurea</i> <i>Giberella fujikuroi</i> <i>Martierella isabellina</i>

Carotene	<i>Phycomyces blakesleanus</i>
Protéines recombinantes Interleukine-6 humaine Activateur tissulaire du plasminogène (tPA)	<i>Aspergillus niger</i> et <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Aspergillus niger</i>

6. Champignons phytopathogènes

Les champignons phytopathogènes qui sont essentiellement classés comme nécrotrophes (infectent et tuent les tissus de l'hôte et extraient les nutriments des cellules mortes de l'hôte), biotrophes (colonisent le tissu vivant de l'hôte et obtiennent des nutriments du tissu vivant) et hémibiotrophes (présentent deux phases au cours du processus d'infection : la première est une phase biotrophique initiale suivie d'une phase nécrotrophique) constituent l'un des principaux agents infectieux chez les plantes, provoquant des altérations au cours des stades de développement, y compris après la récolte, obtenant des nutriments des plantes qu'ils envahissent et, par conséquent, entraînant d'énormes dommages économiques (**Pusztahelyi et al., 2015**).

6.1. Facteurs de virulence des champignons phytopathogènes

Les facteurs de virulence fongiques font référence à des composés qui sont produits lorsque des champignons phytopathogènes entrent en contact avec des plantes. Leur métabolisme est initié chez les champignons par les réactions physiologiques et biochimiques qui se produisent lors de processus tels que les interactions moléculaires de surface et la transmission de signaux, et ces facteurs agissent comme des agents pathogènes pour les plantes. Ces facteurs sont principalement des enzymes, telles que des enzymes dégradant la paroi cellulaire, des toxines, des régulateurs de croissance et leurs analogues (**Vincent et al., 2020**).

6.1.1. Enzymes dégradant la paroi cellulaire

Les enzymes dégradant la paroi cellulaire et la cuticule de la plante hôte facilitent l'invasion, la colonisation et l'expansion des champignons pathogènes (**Guerriero et al., 2015**). Les principales enzymes dégradant la paroi cellulaire sont la pectinase, la cellulase et

la protéase. Dans les tissus végétaux vivants, les cellulases sécrétées par les agents pathogènes jouent un rôle dans le ramollissement et la décomposition du matériau de la paroi cellulaire (**Lara-Márquez *et al.*, 2011**).

Pour surmonter la barrière de la paroi cellulaire végétale, les champignons phytopathogènes produisent des enzymes qui se concentrent sur la déconstruction de la cellulose, du xylane et de la pectine de la paroi cellulaire. Ces enzymes sont particulièrement importantes pour les champignons phytopathogènes (**Kubicek *et al.*, 2014**).

La dégradation des polysaccharides de la paroi cellulaire permet non seulement aux agents pathogènes de pénétrer à l'intérieur de la cellule hôte, mais aussi de libérer des sucres pour leur propre croissance, soutenant ainsi le processus d'infection (**Benedetti *et al.*, 2019**).

Les champignons phytopathogènes possèdent une large gamme d'enzymes détruisant les polymères, qui constituent les matériaux de construction des parois cellulaires. Dans un premier temps, le phytopathogène, en utilisant ces enzymes, pénètre dans la cellule et se nourrit de ses nutriments. Ensuite, chez certains phytopathogènes nécrotrophes, ces enzymes sont si actives qu'elles dégradent une plus grande partie de la paroi cellulaire ; avec cette armature solide enlevée, les pressions osmotiques détruisent le protoplaste, la cellule meurt et perd les propriétés immunitaires d'un être vivant. Troisièmement, les phytopathogènes détruisent le septum (ciment intercellulaire qui colle les cellules entre elles), ce qui leur permet de se déplacer plus loin dans les tissus de la plante infectée. Et quatrièmement, les phytopathogènes se nourrissent des produits de dégradation des polymères de la paroi cellulaire (**Dyakov, 2007**).

6.1.2. Toxines

Les champignons phytopathogènes produisent des toxines qui peuvent jouer un rôle clé dans le développement des maladies des plantes. Les phytotoxines (PT) sont largement représentées par des métabolites secondaires de faible poids moléculaire capables de perturber l'activité vitale des cellules végétales ou de provoquer leur mort à des concentrations inférieures à 10 mM. Les PT sont formés par divers organismes (bactéries, plantes et même insectes phytophages) ; néanmoins, les champignons, en particulier ceux phytopathogènes, sont surtout connus sous le nom de producteurs de PT. L'effet des PT sur les plantes est caractérisé par l'apparition de symptômes spécifiques ; le flétrissement et la suppression

générale de la croissance, ainsi que les chloroses, les nécroses et les taches sur les parties aériennes sont les plus courants (**Berestetskiy, 2008**).

Les toxines peuvent provoquer une augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire de la plante hôte, des dommages au système membranaire et un trouble du métabolisme de l'organisme, lui faisant ainsi perdre ses fonctions physiologiques normales et potentiellement mourir (**Lyu et al., 2015**).

Les phytotoxines fongiques appartiennent à différentes classes telles que les polycétides, les phénols et les acides phénoliques, les terpénoïdes, les métabolites azotés en fonction de leurs voies de biosynthèse et de leurs caractères structurels (**Xu et al., 2021**).

6.1.3. Régulateurs de croissance

Lorsqu'ils envahissent les plantes, la plupart des champignons pathogènes produisent des régulateurs de croissance des plantes, tels que l'auxine (AUX), les cytokinines (CK), l'éthylène (ET), l'acide abscissique (AAB), les brassinolides (BR), l'acide jasmonique (AJ), et l'acide salicylique (AS), pour perturber les niveaux des hormones endogènes chez les plantes et affaiblir les défenses de la plante (**Chanclud et Morel, 2016**).

6.1.4. Protéines effectrices

Les champignons phytopathogènes sécrètent des protéines qui peuvent interagir avec les plantes hôtes au cours du processus d'infection de l'hôte. Ces protéines, appelées protéines effectrices, jouent un rôle important dans les cellules végétales et affectent ainsi l'interaction entre les agents pathogènes des plantes et leurs hôtes (**De Guillen et al., 2015**).

Les avirulences (Avr) et les effecteurs nécrotrophes ([EN], également connus sous le nom de toxines sélectives de l'hôte) sont les principales classes d'effecteurs spécifiques à l'hôte. Les effecteurs Avr sont généralement associés à des agents pathogènes biotrophes où la reconnaissance est effectuée par des protéines de résistance de l'hôte (R). La reconnaissance entraîne une réponse immunitaire de l'hôte conduisant à la résistance. En l'absence de reconnaissance de la protéine R, les effecteurs Avr peuvent aider à la virulence en manipulant le système immunitaire de l'hôte en faveur de l'agent pathogène dans un processus connu sous le nom de susceptibilité déclenchée par les effecteurs. Les EN fonctionnent comme des facteurs de pathogénicité qui induisent la mort des tissus sur les plantes hôtes qui possèdent un génotype de sensibilité/susceptibilité dominant (**Stergiopoulos et De Wit, 2009**).

6.1.5. Lipides

La pathogénicité fongique est bien déterminée par les fractions lipidiques constituant la membrane plasmique. Il a été démontré que certains glycosphingolipides, tels que le glucosylcéramide (GlcCer), sont impliqués dans la régulation de la virulence des champignons affectant les plantes. GlcCer est synthétisé dans l'appareil de Golgi et atteint la membrane plasmique où il est principalement localisé. GlcCer possède un squelette de glucose et de céramide β -liés. Ce dernier est composé d'une base sphingoïde caractéristique avec des doubles liaisons au carbone 4 et au carbone 8 en conformation trans et une méthylation en position 9 liée à un acide gras via une liaison amide (Rella *et al.*, 2016). Divers types de glycolipides, y compris le glucosylcéramide (GlcCer), ont été signalés comme des facteurs de virulence. De plus, le rôle des lipides de la membrane plasmique dans les mécanismes de virulence a également été rapporté, ce qui assigné différentes fonctions, y compris la résistance aux médicaments, la formation de biofilm et la libération de vésicules extracellulaires (Meena *et al.*, 2019).

7. Le genre *Alternaria*

7.1. Historique

Le genre *Alternaria* a été établi par Nees en 1816 et depuis lors, sa taxonomie a été contestée. La taxonomie d'*Alternaria* et des genres apparentés est passée par cinq étapes.

La première étape (1816-1850) : l'évaluation de la biodiversité des hyphes alternariens. Au cours de cette période, les quatre genres qui ont une relation directe avec les hyphes alternariens, *Alternaria* Nees 1816, *Brachycladium* Corda 1838, *Macrosporium* 1832, et *Ulocladium* Preuss 1851 ont été admis. Au début de l'année 1833, les genres *Alternaria*, *Macrosporium* et *Stemphylium* ont été confondus, tandis que *Brachycladium* et *Ulocladium* ont été relégués aux oubliettes, et seules quelques espèces ont été décrites au cours de la première étape de l'évaluation taxonomique d'*Alternaria*. L'espèce type d'*Alternaria* était *A. tenuis* Nees 1816, mais le premier nom d'espèce validement publié était *Torula alternata* Fr. 1832 (Lawrence *et al.*, 2016).

La deuxième étape (années 1850-1930) : description de nouvelles espèces. Près de 400 espèces sont apparues au cours de cette période. Environ 300 noms d'espèces ont été décrits sous le nom générique *Macrosporium*. A la fin de la période, la première tentative de révision de la taxonomie et de la nomenclature d'*Alternaria* et de *Macrosporium* a été publiée par

Elliott (1917), qui les a classés en groupes morphologiques basés sur les caractéristiques conidiennes et a proposé six groupes morphologiques d'*Alternaria* avec une espèce représentative pour chaque groupe (Lawrence *et al.*, 2016).

La troisième étape (années 1930-1960) : Toutes les tentatives de définition du genre *Alternaria* se sont heurtées au problème du traitement de nombreux taxons qui ressemblent superficiellement aux espèces types d'*Alternaria*, *Macrosporium* ou *Stemphylium*. La principale conclusion de Wiltshire (1933) était que *Macrosporium* devait être supprimé. Cependant, cette conclusion n'a pas été immédiatement et inconditionnellement acceptée. Neergaard (1945) a proposé trois groupes morphologiques d'*Alternaria*, les appelant sections, sur la base de la morphologie des conidies : section *A. tenuis* (= *A. alternata*) avec 10 conidies caténulées ou plus ; section *A. tenuissima* avec des chaînes courtes de 3-5 conidies ; et section *A. brassicae* avec des conidies portées seules ou produisant rarement une conidie secondaire. Joly (1964) a classé les espèces d'*Alternaria* en trois sections basées principalement sur la couleur, la rigidité ou la symétrie latérale des conidies : la section *Claroeminae* avec des couleurs claires à translucides et jaunâtres ; la section *Brunneoseminae* avec des conidies brunes à brun-rougeâtre pigmentées de manière foncée ; et la section *Rigidae* avec des conidies qui ont un aspect rigide avec un manque de septa longitudinaux. Ces classifications ne respectaient pas les règles de la nomenclature, n'ont pas été largement adoptées et ne sont plus utilisées aujourd'hui (Lawrence *et al.*, 2016).

La quatrième étape (années 1960-2000) : Emory Guy Simmons (1920-2013) a entrepris une réévaluation et une révision complètes de tous les noms et taxons liés au genre *Alternaria*. Simmons a étudié très minutieusement et soigneusement probablement toutes les descriptions publiées, tous les échantillons d'herbier et les souches vivantes. En même temps, d'autres mycologues ont décrit un certain nombre de nouvelles espèces (environ 150 noms légitimes), mais le nombre de nouveautés taxonomiques de Simmons (environ 200) est le plus important de l'histoire d'*Alternaria*. A ce stade, l'ordre a été établi dans la nomenclature des hyphes alternariens. Jusqu'à la fin des années 2000, le système de nomenclature des *Alternaria* visait à la diversité morphologique maximale, à cataloguer la biodiversité et à permettre l'identification morphologique (Lawrence *et al.*, 2016).

La cinquième étape (2003-2015) : taxonomie phylogénétique moléculaire. Cette étape a utilisé une approche complète basée sur l'ADN pour l'analyse de la biodiversité des hyphes

alternariens. Les données morphologiques et moléculaires ont servi de base à plusieurs révisions taxonomiques (Lawrence *et al.*, 2016).

7.2. Taxonomie et classification d'*Alternaria*

La taxonomie des espèces d'*Alternaria* était basée sur la forme, la taille et la septation des conidies, ainsi que sur les modèles de sporulation. Cependant, en raison de l'impact des conditions environnementales sur les caractéristiques morphologiques, l'identification des espèces est restée difficile. D'autre part, les études moléculaires ont révélé de multiples lignées au sein des clades d'espèces d'*Alternaria* et complexes qui n'étaient pas toujours en corrélation avec les groupes d'espèces décrits (Bessadat *et al.*, 2020).

Les espèces d'*Alternaria* ont montré différents styles de vie, c'est-à-dire qu'elles sont saprophytes, endophytes ou pathogènes (Dang *et al.*, 2015). Il s'agit d'un genre pathogène qui provoque des maladies sur un grand nombre de plantes économiquement importantes, notamment la pomme, le brocoli, le chou-fleur, la pomme de terre, la tomate, les agrumes, la poire, la fraise, le tabac, etc (Meena *et al.*, 2017). Plus récemment, environ 300 morphospécies (une identification basée sur les caractères morphologiques) d'*Alternaria* ont été acceptées sur la base de la forme, de la taille, de la septation des conidies, ainsi que des modèles de sporulation. Les espèces d'*Alternaria* à petites spores ont également été redéfinies et divisées en sous-sections caractérisées par la longueur des conidies courtes (50-60 μm) ou moyennes (100-105 μm) produites dans divers modèles de chaînes ramifiées et non ramifiées (He *et al.*, 2021). Les espèces *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. brassicicola*, *A. infectoria* et *A. solani* ont été signalées comme causant des maladies chez près de 400 espèces végétales, dont *A. alternata* infecte près de 100 espèces végétales. Elle est également responsable de maladies post-récolte dans diverses cultures (Meena *et al.*, 2017).

Alternaria comprend 11 espèces (*A. burnsii*, *A. tomato*, *A. jacinthicola*, *A. iridiaustralis*, *A. eichhorniae*, *A. betae-kenyensis*, *A. gaisen*, *A. alstroemeriae*, *A. longipes*, *A. gossypina* et *A. alternata*) et un complexe d'espèces (*A. arborescens*). De plus, l'utilisation de forma specialis (f. sp.) pour indiquer des isolats morphologiquement indiscernables d'*A. alternata* mais infectant des hôtes spécifiques a été suggérée. En particulier, au moins 16 f différents sp. apparaissent dans la littérature, par ex. *A. alternata* f. sp. *mali*, ou *A. alternata* f. sp. *citri* (Garganese *et al.*, 2016).

Selon **Kustrzeba et al., (2014)** la classification d'*Alternaria* se fait par cette manière :

- Royaume : Champignons
- Embranchement : Ascomycota
- Classe : Dothidomycètes (Euascomycètes)
- Ordre : Pléosporales
- Famille : Pleosporaceae
- Genre : *Alternaria*

7.3. Morphologie d'*Alternaria*

Les méthodes d'identification d'*Alternaria* sont principalement basées sur les caractéristiques morphologiques des structures de reproduction concernant la forme, la couleur, la taille et la septation des conidies. Le genre d'*Alternaria* produit de grandes conidies brunes avec des septa longitudinaux et transversaux, portées par des conidiophores discrets, et avec un rétrécissement conique distinct ou "bec" à l'extrémité apicale. Ces structures peuvent être solitaires ou produites en divers modèles de chaînes (**Figure 10**) (**Lopez et Cabral, 1999**).

Chez *A. alternata*, les conidies sont brun moyen avec un bec court et cylindrique, et forment des chaînes longues et très ramifiées (dix conidies ou plus) ; les conidies de *A. tenuissima* sont brun doré, se rétrécissent souvent graduellement en un bec qui fait jusqu'à la moitié de la longueur de la conidie, et se présentent généralement en chaînes non ramifiées de trois à cinq conidies ; chez *A. infectoria*, les conidies sont plus rares, car cette espèce sporule généralement mal dans les milieux communs, ses conidies devenant souvent presque tubulaires et se présentant en chaînes fortement ramifiées, avec des conidiophores secondaires longs et multiseptés qui émergent souvent (**Figure 11**) (**Pastor et Guarro, 2008**).

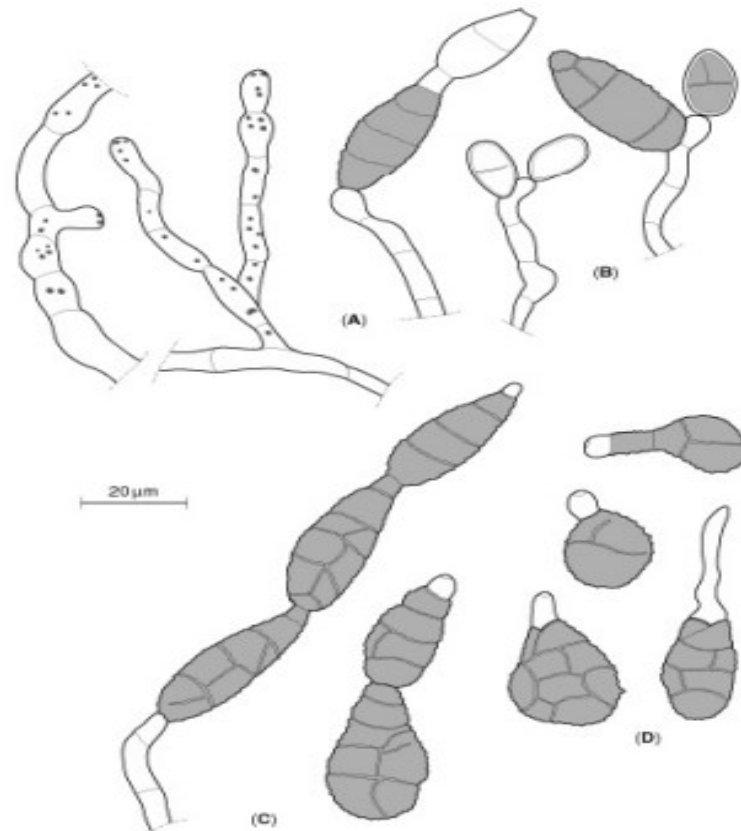


Figure 10. Morphologie d'*Alternaria*. (A) : mycélium. (B) : cellules conidiogènes avec des conidies jeunes. (C) : chaines des conidies matures. (D) : germination conidienne (Lopez et Cabral, 1999).

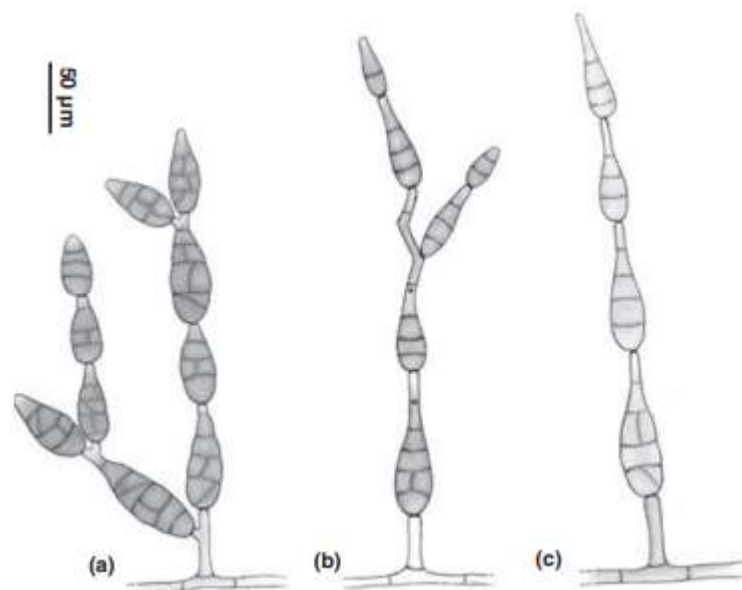


Figure 11. Morphologie des conidies. (a) : *Alternaria alternata* ; (b) *A. infectoria* ; et (c) *A. tenuissima* (Pastor et Guarro, 2008).

7.4. Cycle de vie des espèces phytopathogènes d'*Alternaria*

Les espèces d'*Alternaria* vivent dans le sol, les débris végétaux, les graines et les hôtes alternatifs sous la forme de conidies ou de mycéliums, qui peuvent servir de sources primaires d'inoculum. L'épaisse paroi cellulaire des conidies permet à ces champignons de s'adapter aux conditions climatiques défavorables. Les conidies germent à une température de 8 à 32°C dans des conditions fraîches et humides en présence d'humidité pour former des tubes germinatifs. Les tubes germinatifs pénètrent directement dans les tissus de l'hôte ou pénètrent par les stomates ou les plaies, provoquant ainsi une infection. Les lésions apparaissent après 2 à 3 jours d'infection en fonction des conditions environnementales, de l'âge des feuilles et de la sensibilité du cultivar, et les spores sont produites 3 à 5 jours après l'apparition des lésions (Adhikari *et al.*, 2017).

En général, une longue période d'humidité est nécessaire pour la production de spores, mais les spores sont également produites dans des conditions alternées d'humidité et de sécheresse. Tout d'abord, les conidiophores se développent pendant les nuits humides, qui produisent ensuite des spores ou des conidies dans une autre nuit humide après la période de lumière du jour et de sécheresse. Dans l'étape suivante, les conidies sont rapidement dispersées par le vent et les éclaboussures de pluie et continuent le cycle de la maladie dans d'autres parties saines de la même plante ou de plantes différentes (Figure 12) (Adhikari *et al.*, 2017).

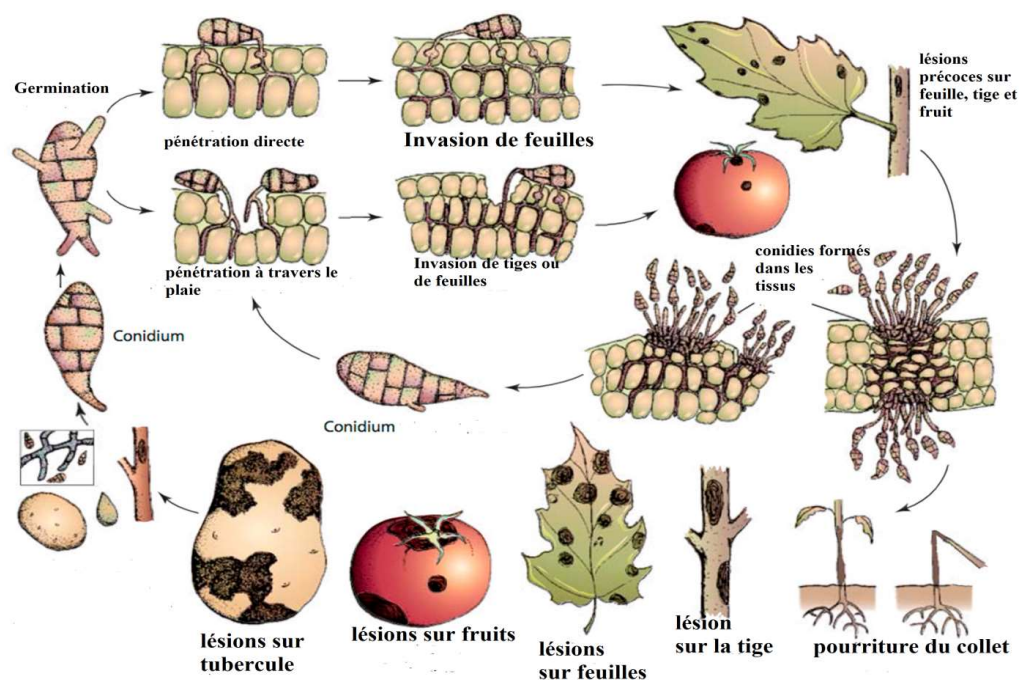


Figure 12. Cycle évolutif d'*Alternaria* sp. (Adhikari *et al.*, 2017).

Alternaria attaque généralement les parties aériennes de son hôte végétaux. Sur les feuilles. Les symptômes d'infection à *Alternaria* commencent généralement par une petite tache sombre et circulaire. Comme la progression de la maladie, les taches circulaires peuvent atteindre 1 cm ou plus de diamètre et sont généralement gris, marron ou couleur presque noire. Ce pathogène n'a pas de taux de croissance uniforme, donc des taches se développent dans une cible motif d'anneaux concentriques. Outre le motif cible, la lésion est aussi souvent recouverte de fines, noires, floues croissance. Cette croissance est le champignon *Alternaria* sporulant sur le tissu hôte mourant. De nombreuses espèces d'*Alternaria* aussi produisent des toxines qui diffusent dans les tissus de l'hôte. Par conséquent, il n'est pas rare de voir un jaune halo qui s'estompe dans les tissus sains de l'hôte qui entourent le point cible. D'autre part, les lésions sombres et enfoncées sont généralement l'expression d'infections à *Alternaria* sur les racines, les tubercules, la tige et les fruits. Le champignon peut sporuler dans ces chancres, provoquant une fine couche noire et veloutée de champignons et de spores pour couvrir la zone affectée (Nayyar *et al.*, 2014).

7.5. Biologie d'*Alternaria*

Les conidiophores de la majorité des espèces d'*Alternaria* produisent des spores asexuées (conidies) mesurant entre 160- 200 μm de longueur. Dans des conditions *in vitro*, la sporulation se produit à une température comprise entre 8 et 24°C, où les spores matures apparaissent après 14 à 24 heures. Les températures optimales se situent entre 16 et 24°C où le temps de sporulation varie de 12 à 14 heures. L'humidité est essentielle pour l'infection et un minimum de 9 à 18 heures est nécessaire pour la majorité des espèces. Une humidité relative de 91,5 % (à 20°C) ou plus entraîne la production d'un grand nombre de spores matures en 24 heures (Mamgain *et al.*, 2013).

La croissance optimale d'*Alternaria* se produit à un pH de 4-5,4. *Alternaria* sp. est capable de se développer dans des concentrations d'oxygène aussi faibles que 0,25 %, les taux de croissance étant proportionnels à la concentration en oxygène. L'activité de l'eau (*aw*) minimale pour la croissance à 25°C est de 0,86. Une croissance plus rapide a été enregistrée à 0,98 *aw* (Patriarca et Pinto, 2018).

7.6. Pathogénicité d'*Alternaria*

Il a été rapporté que les espèces d'*Alternaria* provoquent des maladies chez près de 400 espèces végétales, dans lesquelles *A. alternata* infecte près de 100 espèces végétales. Il est

également responsable de maladies post-récolte dans diverses cultures provoquant l'asthme et l'infection des voies respiratoires supérieures chez l'homme. Les raisons de la pathogénicité sont la production de diverses molécules phytotoxiques (Meena *et al.*, 2017).

7.6.1. Production des enzymes

La production des enzymes par des champignons pathogènes jouent un rôle critique dans l'étape précoce de l'infection des plantes (Waechter *et al.*, 2010).

La pathogénicité des champignons phytopathogènes peut être régulée à plusieurs niveaux, tels que les conditions environnementales, la sécrétion des protéines et des acides aminés, la transduction du signal, la transcription des gènes, tous ces processus nécessitent la production des enzymes importantes (Zhang *et al.*, 2020).

Les systèmes enzymatiques diminuant O_2^- ainsi que H_2O_2 produit par la plante comme une autoprotection contre le stress oxydative. Les enzymes se caractérisent par une grande spécificité vis-à-vis des espèces réactives de l'oxygène ROS (Reactive oxygen species), une compartimentation intracellulaire différente et la présence d'ions métalliques comme catalyseurs, par exemple le cuivre, le zinc, le manganèse, le fer et le sélénium. Ces enzymes sont indispensables à l'activité vitale et virulente des cellules pathogènes (Gessler *et al.*, 2007).

7.6.1.1. Cystathionine béta lyase (CBL)

La voie de biosynthèse de la méthionine est une cible commune pour les agents antifongiques en raison de la présence de la voie de biosynthèse de la méthionine dans les microorganismes et de son absence dans le règne animal (Gai *et al.*, 2019).

Chez *A. alternata* la biosynthèse de la méthionine, contribue également à la tolérance au stress oxydatif, la régulation de la formation des conidies, la croissance mycélienne et la pathogénicité fongique d'*A. alternata* (Gai *et al.*, 2019).

La CBL catalyse l'avant-dernière étape de la biosynthèse de la méthionine, c'est-à-dire le clivage de la L-cystathionine en L-homocystéine, pyruvate et ammoniac. La CBL partage une grande homologie avec la cystathionine γ -synthase (CGS). Les CBL bactériennes et fongiques sont des tétramères composés de quatre sous-unités identiques. Chaque site actif contient une molécule de cofacteur liée à une fente formée entre les interfaces du dimère. Les résidus des deux monomères participent à la liaison du substrat et à la catalyse (Clausen *et al.*, 1996).

L'homocystéine est ensuite soit méthylée en méthionine, soit transsulfurée en cystathionine en cystéine. Alors que la méthionine et la cystéine sont interconvertibles chez les champignons, le régulateur clé de l'absorption et de l'assimilation du sulfate, y compris la synthèse des acides aminés soufrés (Hell et Wirtz, 2011).

Les fongicides de la famille anilinopyrimidine : Cyprodinil, Pyrimethanil, et Mepanipyrim ont été identifiés comme des inhibiteurs de la biosynthèse de la cystathionine dans des cultures liquides de champignons filamenteuses (Waechter *et al.*, 2010).

7.6.1.2. Glutathione reductase

La glutathion réductase est une protéine contenant du FAD qui réduit le glutathione oxydé (GSSG) en glutathione réduit (GSH) en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons (Sato *et al.*, 2009).

Le glutathion (GSH) est un antioxydant cellulaire majeur qui protège les cellules des dommages oxydatifs (Kim *et al.*, 2019).

Au cours de l'interaction entre la plante et l'agent pathogène, lorsque l'envahisseur se propage de manière systémique dans toute la plante, le rôle principal du glutathion semble être de protéger la cellule fongique contre les dommages oxydatifs et les stress causés par les plantes pour leurs défenses (Zechmann, 2020).

Les genre phytopathogènes d'*Alternaria* utilise cette enzyme dans le but de la protection contre le stress oxydatif des plantes et la détoxification de H₂O₂ (Yang *et al.*, 2016).

Le GSH est impliqué dans les fonctions cellulaires de base ainsi que dans le maintien de la structure des mitochondries, de l'intégrité des membranes, de la différentiation et du développement des cellules. Il est présent en concentration élevée, jusqu'à 10 mM, dans les levures et les champignons filamenteux (Von Logau, 2004).

7.6.1.3. Homoserine O-acétyl transférase

Les espèces d'*Alternaria* tel que *A. alternata* produit la toxine d'*A. citri* (ACT) et est l'agent causal de la tache brune des agrumes qui entraîne des pertes de rendement importantes dans le monde entier. La production d'ACT et la capacité de détoxifier les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont nécessaires pour la pathogénicité d'*A. alternata* chez les agrumes. La formation de cette toxine se fait par un grand nombre d'enzyme telle que l'homosérine O-acétyltransférase (Wang *et al.*, 2016).

L'homosérine O-acétyltransférase (HTA ; EC 2.3.1.31) se situe à un point de branchement de la voie métabolique de l'aspartate qui mène à la biosynthèse des acides aminés essentiels comme le méthionine et lysine dans la plupart des plantes, bactéries et champignons (**Thangavelu et al., 2014**).

La l-homosérine est le point de branchement qui peut mener en deux étapes à la biosynthèse soit de la l-thréonine puis de la l-isoleucine à la l-isoleucine, soit en plusieurs étapes à la l-méthionine (branche méthionine). Ces voies impliquent plusieurs interactions complexes qui font qu'elles sont très recherchées en termes d'une nouvelle cible potentielle pour les antifongiques. Le blocage de l'action de ces enzymes entraîne souvent l'avirulence ou l'inhibition de la croissance (**Kuplinska et Rząd, 2021**).

7.6.1.4. Pecate lyase

Les pectines sont des hétéropolysaccharides structuraux et des composants clés des parois cellulaires primaires et secondaires des plantes, et elles sont importantes pour la protection des plantes contre les stress abiotiques et l'invasion biotique (**Cho et al., 2015**).

Pour un style de vie parasitaire réussi, une invasion efficace et une colonisation ultérieure sont cruciales et le nombre de gènes impliquée dans ce processus est supposé être augmenté. Les enzymes digérant la pectine en sont des exemples importants. Il existe 19 pecates lyases chez *A. brassicicola*. Les enzymes digérant la pectine sont impliquées dans l'invasion et la colonisation des tissus hôtes en dépolymérisant les pectines dans la lamelle moyenne et les parois cellulaires végétales, ce qui en fait des facteurs de virulence importants. Six gènes de pecate lyase sont induits au cours des derniers stades de l'infection, après la colonisation, lorsque les tissus végétaux sont nécrotiques (**Cho et al., 2015**).

La pecate lyase (PL) (EC 4.2.2.1) agit sur les régions homo-galacturoniques de la pectine par des mécanismes de clivage hydrolytique et de trans-élimination, respectivement (**Atanasova et al., 2018**).

Les enzymes dégradant la pectine sont essentielles pour les agents pathogènes fongiques qui n'ont pas de structures de pénétration spécialisées, ainsi que pour les pathogènes nécrotrophes pendant les dernières étapes du processus d'invasion. La sécrétion des enzymes de dégradation de la pectine pendant l'infection des plantes a été signalée par divers champignons phytopathogènes (**Niture et al., 2008**).

7.6.1.5. Thioredoxine peroxidase et thioredoxine réductase

Les thiorédoxines sont de petites protéines distribuées de manière ubiquitaire, dont la masse moléculaire est de 12-13 kDa. Grâce à leur paire de cystéines dans le site actif, elles sont capables de passer de l'état oxydé à l'état réduit et l'inverse est vrai (**Thon *et al.*, 2007**).

Le système de la thiorédoxine, qui comprend la thiorédoxine peroxidase (également connue sous le nom de protéine antioxydante spécifique des thiols), la thiorédoxine réductase et le NADPH, joue un rôle essentiel dans la régulation de la biosynthèse de la méthionine, de la croissance cellulaire, de la transcription des gènes, de l'apoptose et la défense cellulaire contre les dommages oxydatifs (**Ma *et al.*, 2018**).

Les petites protéines contenant des thiols jouent une gamme de rôles régulateurs et métaboliques dans les cellules. Le système de thiorédoxine est nécessaire pour la résistance au H₂O₂ et à d'autres oxydants toxiques et pour la croissance et le développement d'*Alternaria*. Les analyses génétiques montrent également que certaines protéines contenant des thiols, mais pas toutes, sont associées à la résistance au stress osmotique et à la sensibilité/résistance aux fongicides chimiques (**Ma *et al.*, 2018**).

La thiorédoxine réductase, un homodimère de flavoenzyme qui lie la flavine adénine dinucléotide et le NADPH réduit l'oxydoréductase thiorédoxine et se trouve sous deux formes. L'isoforme de poids moléculaire élevé, qui a très probablement évolué à partir de glutathione réductase, est présente chez les mammifères et certains parasites, tandis que l'isoforme de faible poids moléculaire se trouve dans la plupart des bactéries, des plantes et des champignons (**Missall et Lodge, 2005**).

La thiorédoxine peroxydase est une protéine cytosolique qui catalyse la conversion d'hydroperoxyde d'alkyle en eau et en alcools. Il peut également être important pour éliminer les radicaux thiol des cellules (**Powers et Sen, 2000**).

7.6.2. Production des toxines

Les espèces *Alternaria* spp. ont la capacité de produire plus de 70 toxines, qui jouent un rôle important dans la pathogénicité fongique et la sécurité alimentaire, car certaines d'entre elles sont nocives pour les humains et les animaux (**Escriva *et al.*, 2017**).

7.6.2.1. Toxines non spécifiques à l'hôte

Environ 30 métabolites secondaires sont connus et caractérisés dans lesquels l'alternariol (AOH), l'alternuène (ALT), le zinniol, l'acide ténuazonique (TeA), l'éther monométhylque d'alteriol (AME), la brefeldine A, la tentoxine (TEN), la curvularine, et l'alterotoxine (ATX) I, II, III, sont quelques-unes des toxines connues produites par différentes espèces d'*Alternaria* (Andersen *et al.*, 2015). Le zinniol perturbe la perméabilisation membranaire (Thuleau *et al.*, 1988), et la tentoxine inhibe la photophosphorylation des chloroplastes en se liant à l'ATP synthase, ce qui entraîne l'hydrolyse de l'ATP et l'inhibition de la synthèse de l'ATP (Steele *et al.*, 1978). Fujiwara *et al.* (1988) ont suggéré que les actions de la brefeldine A sur le complexe de Golgi provoquent le désassemblage et agissent comme un inhibiteur de sa sécrétion, tandis que la curvularine inhibe la division cellulaire par perturbation de l'assemblage des microtubules (Robeson et Strobel, 1981) et que l'acide ténuazonique inhibe le processus de synthèse des protéines (Meronuck *et al.*, 1972).

7.6.2.2. Toxines spécifiques à l'hôte

Sur la base d'observations scientifiques, sept toxines ont été identifiées à partir d'*A. alternata*. Ces dernières sont des familles de composés naturels de bas poids moléculaire de divers groupes étroitement liés: (1) l'acide époxy-décatriénoïque (EDA) - AK-, AF- et ACT - sont les composés toxiques connus de cette famille, (2) le depsipeptide cyclique (tétrapeptide cyclique), la toxine AM également connue sous le nom d'alternariolide, (3) Amino pento/polykétide (il s'agit d'un composé analogue de la sphinganine) - toxine AAL, et (4) polykétide - toxine ACR (syn. ACRL-toxine) (Tsuge *et al.*, 2013).

La HC-toxine (un tétrapeptide cyclique), une toxine qui a également été découverte dans l'espèce *Alternaria jesenskae*, pathotype de *Fumana procumbens* (Wight *et al.*, 2013).

Le champignon filamentueux *Alternaria alternata* produit une toxine sélective de l'hôte unique qui tue les cellules hôtes avant l'invasion et l'acquisition des nutriments (Gai *et al.*, 2019).

7.6.3. Production de mélanine

Le "mélanine" est un groupe de polymères divers et complexes de masse moléculaire élevée, caractérisés par une charge négative et une hydrophobie. Ces pigments sombres, sont produits par des animaux, des plantes et des microbes. Ils sont formés par la polymérisation

oxydative de composés phénoliques ou indoliques. Chez les champignons, les mélanines peuvent être synthétisées à partir d'un substrat endogène via un intermédiaire 1,8-dihydroxynaphtalène (DHN) ou, alternativement, à partir de la 1-3,4-dihydroxyphénylalanine (1-DOPA) (**Eisenman et Casadevall, 2012**).

Chez *Alternaria* spp., seule la voie DHN-mélanine pour la synthèse de la mélanine a été décrite, et le groupe de gènes requis pour la synthèse de la mélanine a été cloné chez *Alternaria alternata* (**Kimura et Tsuge, 1993**).

Chez *Alternaria* spp, la mélanine est présente dans les conidies. Ce pigment est probablement impliqué dans le développement des conidies, car il a été montré que la perturbation d'un gène de biosynthèse de la mélanine chez *A. alternata* conduit à une réduction de la taille des conidies ainsi que du nombre de septa (**Kawamura et al., 1999**).

La majorité des mélanines fongiques sont obtenues à partir du précurseur 1,8-dihydroxynaphtalène (DHN) et sont appelées mélanines DHN ; la voie de biosynthèse qui produit le DHN est connue sous le nom de voie du pentaketide (**Bell et Wheeler, 1986**). Le malonyl-CoA sert de précurseur à l'enzyme polykétide synthase (PKS1), qui catalyse la première étape de la voie de biosynthèse. La PKS transforme le malonyl-CoA en un premier intermédiaire, le 1,3,6,8-tétrahydroxynaphtalène (1,3,6,8-THN). Ensuite, une enzyme réductase particulière convertit le 1,3,6,8-THN en scytalone. La scytalone est déshydratée en 1,3,8-trihydroxynaphtalène, qui est ensuite réduit par une seconde réductase en vermélone, elle-même catalysée par la scytalone déshydratase, ce qui donne l'intermédiaire 1,8-DHN, qui donne son nom à cette voie (**Figure 13**) (**Belozerskaya et al., 2017**).

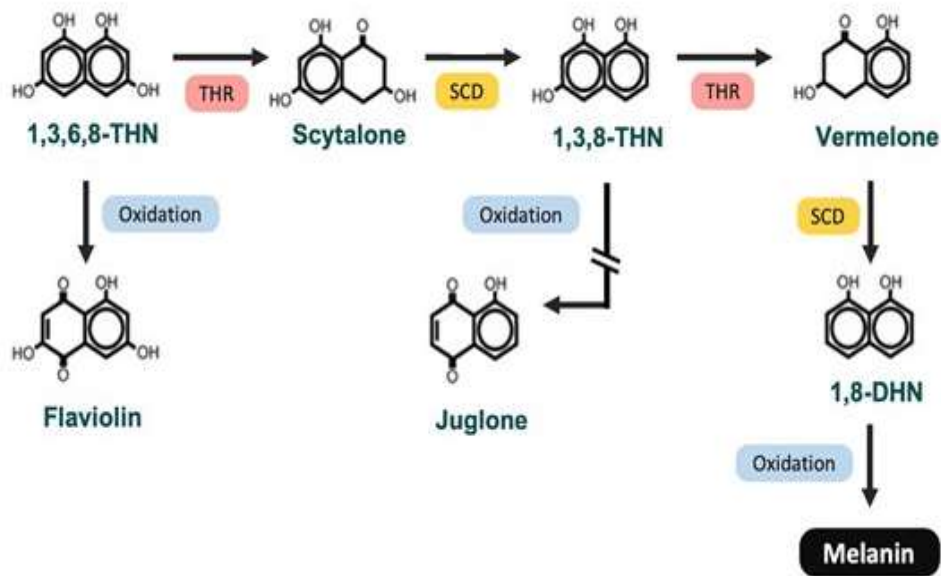


Figure 13. La voie de biosynthèse mélanine -DHN (Lim *et al.*, 2022).

7.7. Effet négatives d'*Alternaria* sur la santé

Alternaria infecte principalement les hôtes immunodéprimés. Bien que des infections chez des hôtes immunocompétents aient également été rapportées, elles impliquent rarement une maladie invasive. La porte d'entrée de l'infection se fait généralement par un traumatisme cornéen ou une rupture de la barrière cutanée. La majorité des manifestations cliniques impliquent des infections cutanées et sous-cutanées, bien que d'autres types d'infections, par ex. l'oculomycose, la sinusite, l'onychomycose et les maladies invasives ont également été signalées moins fréquemment (Pastor et Guarro, 2008).

Chapitre 3. Approches d'analyse computationnelle

1. Docking moléculaire

1.1. Définition

Le docking moléculaire ou l'amarrage moléculaire est une méthode de calcul utilisée pour prédire l'interaction de deux molécules en générant un modèle de liaison. Dans de nombreuses applications de découverte de médicaments, le docking moléculaire est réalisé entre une petite molécule et une macromolécule, par exemple, le docking protéine-ligand (**Prieto Martinez et al., 2018**).

Le docking moléculaire est une méthode de calcul permettant de trouver l'orientation la plus favorable d'une molécule par rapport à une autre lorsqu'elles interagissent pour former un complexe stable avec une énergie globale minimale (**Naqvi et al., 2018**).

Le docking moléculaire peut également être défini comme une méthode qui anticipe l'orientation privilégiée d'un ligand par rapport à un récepteur (protéine) afin d'obtenir une liaison stable du ligand contre le récepteur (protéine) pour former un complexe stable (**Lengaur et Rarey, 1996**).

Le processus de docking comprend deux étapes fondamentales : la prédiction de la conformation du ligand ainsi que de sa position et de son orientation dans le site actif (généralement appelée pose) et l'évaluation de l'affinité de liaison. Ces deux étapes sont liées respectivement aux méthodes d'échantillonnage et aux systèmes de notation (**Meng et al., 2011**).

a) Prédiction de pose : les algorithmes d'amarrage effectuent généralement des prédictions de pose qui visent à identifier les caractéristiques moléculaires responsables de la reconnaissance moléculaire (**Kitchen et al., 2004**).

b) Prédiction de l'affinité : après la prédiction de pose par l'algorithme d'amarrage, l'étape immédiate du processus d'amarrage est la prédiction de l'affinité, également appelée notation (scoring). Le score d'amarrage est obtenu par les fonctions de notation associées au logiciel d'amarrage particulier. Les fonctions de notation sont conçues pour calculer l'activité biologique en estimant les interactions entre le composé et la protéine cible. Au cours des premières étapes des expériences d'amarrage, la notation est effectuée sur la base de la forme simple et des complémentarités électrostatiques. Cependant, actuellement, les conformères d'amarrage sont souvent traités avec des méthodes de notation sophistiquées qui incluent les

interactions de Van der Waals, les interactions électrostatiques, les effets de solvation et les effets entropiques (Gohlke et Klebe, 2002 ; Young, 2009).

1.2. Algorithmes du docking moléculaire

Essentiellement, l'objectif du docking moléculaire est de donner une prédiction de la structure du complexe ligand-récepteur. Le docking peut être réalisé en deux étapes : tout d'abord en échantillonnant les conformations du ligand dans le site actif de la protéine, puis en classant ces conformations par une fonction de notation (score). Idéalement, les algorithmes d'échantillonnage doivent être capables de reproduire le mode de liaison expérimental et la fonction de notation doit également le classer le plus élevé parmi toutes les conformations générées (Meng *et al.*, 2011).

L'algorithme de recherche consiste à trouver le mode de liaison optimal entre le petit ligand et sa protéine réceptrice autour du site de liaison. Dans le docking moléculaire, des algorithmes de recherche sont utilisés pour explorer l'énergie libre afin de trouver les meilleures poses de ligands. En théorie, l'espace de recherche est constitué de toutes les orientations et conformations possibles de la protéine appariée avec le ligand mais en pratique, avec les ressources informatiques actuelles, il est impossible d'explorer de manière exhaustive l'espace de recherche ; cela impliquerait d'énumérer toutes les distorsions possibles de chaque molécule et toutes les rotations et conformations possibles (Tripathi et Misra, 2017).

Divers algorithmes d'échantillonnage ont été développés et largement utilisés dans les logiciels de docking. Selon la flexibilité de la protéine et du ligand, les algorithmes d'amarrage peuvent être divisés en 3 types (Kasam, 2009), comme suit (Figure 14).

a) Le docking rigide : appelé aussi docking de porte et clé (la cible et le ligand sont tous deux des molécules rigides), la conformation du système de docking (récepteur et ligand) ne change pas. En outre, l'amarrage rigide ne nécessite pas de calculs multiples, ce qui en fait la méthode la plus simple. Il est adapté aux grands systèmes, tels que les systèmes protéine-protéine (Tao *et al.*, 2020).

c) Docking semi-flexible : appelé aussi docking par ajustement induit (la cible étant une molécule rigide). Pendant le processus d'amarrage semi-flexible, la conformation du récepteur fixe reste inchangée, tandis que la conformation du ligand est modifiée. Par conséquent, il est évident que la longueur de la liaison ou l'angle de la partie non critique de la structure du ligand peut être fixé (Morris *et al.*, 1998).

d) **Docking flexible** (les deux molécules en interaction sont flexibles). Au cours de ce processus, la procédure d'amarrage permet de modifier facilement la conformation (récepteur et ligand). Les variables du récepteur et du ligand augmentent avec le nombre d'atomes, ceux-ci incluent le fait que le calcul est substantiel et que le processus d'amarrage est trop compliqué. L'amarrage flexible est généralement utilisé pour étudier avec précision l'interaction entre les molécules (Roy *et al.*, 2018).

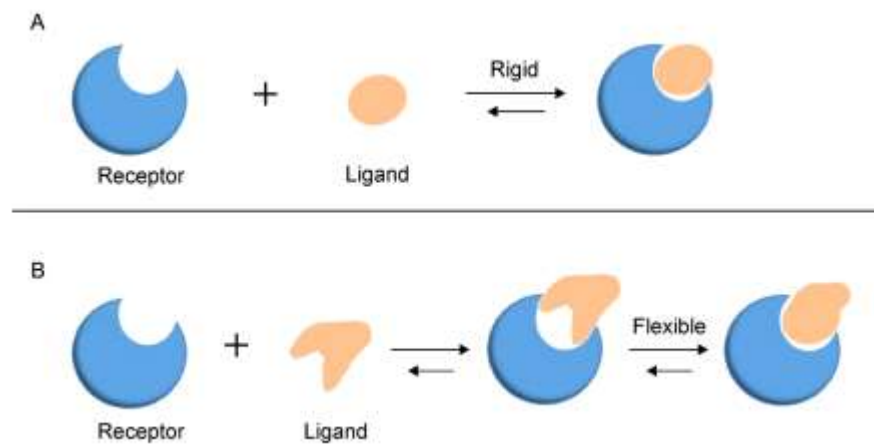


Figure 14. Types de docking moléculaire (Fan *et al.*, 2019)

Basées sur le principe de la génération de conformation, les méthodes de recherche sont classées en systématiques, stochastiques et déterministe (Brooijmans et Kuntz, 2003).

Des algorithmes de recherche systématiques sont normalement utilisés pour l'amarrage de ligand flexibles, qui génèrent toutes les conformations de liaison de ligand possibles en explorant tous les degrés de liberté du ligand. Il existe trois types de méthodes de recherche systématique : recherche exhaustive, fragmentation et ensemble conformationnel (Huang et Zou, 2010).

Les algorithmes de recherche stochastique effectuent des changements aléatoires dans les degrés de liberté du ligand. Cependant, ce type d'algorithme ne garantit pas la convergence vers la meilleure solution. Pour l'améliorer, un processus itératif peut être effectué (Torres *et al.*, 2019).

Dans la recherche déterministe, l'orientation et la conformation du ligand à chaque itération sont déterminées par l'état précédent, et le nouvel état a une valeur énergétique égale ou inférieure au précédent, ce type d'algorithme a un coût de calcul plus élevé et conduit souvent au piégeage indésirable des conformations résultantes à un minimum d'énergie locale (Torres *et al.*, 2019).

L'algorithme de recherche positionne les molécules dans divers emplacements, orientations et conformation au sein du site actif. Certains des premiers programmes d'amarrage ont positionné une molécule dans le site actif, la maintenant rigide par rapport aux changements de conformation, mais tous les algorithmes d'amarrage modernes incluent des changements de conformation du ligand. Le choix de l'algorithme de recherche détermine la précision avec laquelle le programme vérifie les positions possibles des molécules et la durée de son exécution. L'algorithme de recherche ne détermine pas si le programme d'amarrage donne des résultats précis. Mais la fonction de scoring est chargée de déterminer si les orientations choisies par l'algorithme de recherche sont énergétiquement les plus favorables, et est chargée de calculer l'énergie de liaison. Ainsi, un algorithme de recherche qui n'échantillonne pas complètement l'espace donnera des résultats inexacts si l'orientation correcte n'est pas échantillonnée. Cependant, la plupart des fonctions de recherche échantillonneront l'espace de manière adéquate si elles reçoivent les paramètres d'entrée corrects. De nombreux algorithmes de recherche ont été développés en fonction des principes de génération de conformation. L'un des premiers algorithmes utilisés était l'algorithme de recherche de Monte Carlo, qui est construit autour d'un générateur de nombres aléatoires. Dans la mise en œuvre la plus simple, la position, l'orientation et la conformation sont toutes choisies au hasard. Parfois, la position et la conformation sont vérifiées indépendamment. Ainsi, une position est choisie et de nombreuses conformations sont testées dans cette position ; puis une nouvelle position est choisie et le processus se répète (**Kenton, 2019**).

1.3. Fonction de notation (scoring)

De nombreux algorithmes d'amarrage ont été développés à l'origine pour simuler la liaison du ligand dans une poche à la surface de la protéine repliée. Certains programmes ont des difficultés à ancrer les composés dans le site actif qui est complètement fermé. Cela peut se produire lorsque la protéine se replie sur le site actif ou que l'ensemble du site actif s'ouvre et se ferme via un mouvement de coquille de palourde de deux grandes sections de la protéine. Lorsque cela se produit, des entrées supplémentaires sont nécessaires pour permettre au programme d'ancrage de fonctionner correctement avec un site actif encapsulé (**Young, 2009**).

Dans les domaines de la chimie computationnelle et de la modélisation moléculaire, les fonctions de notation sont des méthodes mathématiques approximatives rapides utilisées pour prédire la force de l'interaction intermoléculaires (également appelée affinité de liaison) entre

deux molécules après leur amarrage. Le plus souvent, l'une des molécules est un petit composé organique tel qu'un médicament et la seconde est la cible biologique du médicament telle qu'un récepteur de protéine (Venkata *et al.*, 2017).

Alors que l'amarrage vise à reproduire une conformation de liaison proche de la structure cristalline des rayons X, le but du scoring est de quantifier l'énergie libre associée à la protéine et au ligand dans la formation des interactions protéine-ligand. La plupart des logiciels de docking sont équipés de fonctions de scoring, qui permettent de calculer l'énergie libre associée aux interactions protéine-ligand (score de docking). Le score d'amarrage est utilisé pour classer les composés chimiques dans une campagne de criblage virtuel. De larges gammes de fonctions de notation sont disponibles pour calculer la liaison entre la protéine et le ligand virtuel (Moitessier *et al.*, 2008).

Les fonctions de notation sont généralement divisées en trois grandes catégories : les fonctions basées sur le champ de force, les fonctions basées sur la connaissance et les fonctions empiriques (Wang *et al.*, 2003).

1.3.1. Les fonctions basées sur le champ de force

Les fonctions basées sur le champ de force consistent en une somme de termes d'énergie d'un champ de force classique, en considérant généralement les énergies d'interaction du complexe protéine-ligand et l'énergie interne du ligand (Guedes *et al.*, 2018).

Ces fonctions sont développées sur la base des interactions atomiques physiques, y compris les interactions de van der Waals, les interactions électrostatiques et les forces d'étirement et de torsion des liaisons. Les fonctions et les paramètres du champ de force sont généralement dérivés à la fois de données expérimentales et de calculs de mécanique quantique selon les principes de la physique (Huang *et al.*, 2010). Cette méthode calcule séparément les forces intramoléculaires (entre atomes liés) et les forces intermoléculaires (entre atomes non liés) résultant en une prédiction de la contribution enthalpique à l'énergie de liaison (Krumrine *et al.*, 2003). Ce qui suit représente l'équation d'énergie totale basée sur le champ de force (Huang *et al.*, 2010) : $E_{\text{Totale}} = E_{\text{liés}} + E_{\text{non-liés}}$ où les composantes des contributions covalentes et non covalentes sont données par les équations suivantes :

$$E_{\text{liés}} = E_{\text{bonde}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{dihédrale}}$$

$$E_{\text{non-liés}} = E_{\text{electrostatique}} + E_{\text{Van Der Waals}}$$

où:

- E_{bond} représente l'énergie potentielle des liaisons covalentes.
- E_{angle} représente l'énergie potentielle entre les liaisons angulaires.
- $E_{\text{dihédrale}}$ représentent l'énergie potentielle de torsion des atomes liés.
- $E_{\text{électrostatique}}$ représente l'énergie potentielle des forces électrostatiques.
- $E_{\text{van der Waals}}$ représente l'énergie potentielle des forces de van der Waals.

1.3.2. Les fonctions basées sur la connaissance

Les fonctions d'attribution de score basées sur la connaissance sont récemment apparues comme une nouvelle approche. Ils sont appelées fonctions de notation basées sur le potentiel statistique, dans laquelle des distances atomiques statistiques entre les atomes de la protéine et les atomes du ligand sont utilisées. Lorsqu'elles sont comparées, un terme « d'énergie libre » est dérivé pour décrire chaque interaction entre paires d'atomes. La somme de toutes les interactions entre paires d'atomes est ensuite utilisée pour évaluer la force globale de l'interaction de chaque complexe protéine-ligand (Yang *et al.*, 2006).

Les potentiels d'interaction des paires d'atomes sont généralement dérivés des informations structurelles stockées dans les bases de données (base de données structurelle ChemBridge et banque de données sur les protéines) des complexes protéine-ligand. Il repose sur l'hypothèse que l'occurrence répétée d'interactions intermoléculaires étroites entre certains types de groupes fonctionnels ou de types d'atomes est énergétiquement plus favorable que les interactions se produisant au hasard, contribuant ainsi de manière complémentaire à l'affinité de liaison. La nature robuste de cette fonction de scoring la rend utilisable en criblage virtuel. Les fonctions de notation basées sur les connaissances reposent sur des bases de données d'interactions intermoléculaires existantes (Sapundzhi *et al.* 2019).

1.3.3. Les fonctions empiriques

Les fonctions de notation empiriques sont basées sur l'idée que les énergies libres de liaison peuvent être écrites comme une somme pondérée de termes non corrélés, tels que les liaisons hydrogène, les contacts non polaires et aromatiques ou les pénalités d'entropie (Zoete *et al.*, 2009).

Ces fonctions de notation sont conçues pour reproduire des données expérimentales. Ils sont adaptés pour utiliser une somme de plusieurs termes individuels non corrélés pour reproduire des résultats expérimentaux, tels que les énergies libres de liaison, au moyen d'une analyse de régression. Les termes individuels sont normalement rapides à calculer, mais le succès de ces fonctions de notation dépend des données expérimentales utilisées dans le processus de paramétrage. Ce processus n'est pas contrôlé par l'utilisateur et est facilement non transférable (Vieira et al., 2019).

Dans les fonctions de notation empiriques, le score d'énergie de liaison d'un complexe est calculé en additionnant un ensemble de termes d'énergie empiriques pondérés tels que l'énergie de van der Waals, l'énergie électrostatique, l'énergie de liaison hydrogène, le terme d'entropie, le terme d'hydrophobie (Huang et Zou, 2010).

Les fonctions de notation tentent d'estimer l'affinité de liaison, qui est directement liée à l'énergie de liaison de Gibbs. Il existe plusieurs façons de décrire les partitions de l'énergie de liaison et l'une d'entre elles est décrite dans l'équation. Cette partition décrit l'énergie de liaison en composantes individuelles : l'énergie de solvation/désolvation ($\Delta G_{\text{solvant}}$) ; le changement d'énergie du récepteur et du ligand dû à la formation de complexes (ΔG_{conf}) ; la variation d'énergie due aux interactions spécifiques entre le ligand et le récepteur (ΔG_{int}) ; et la contribution due aux changements de mouvement (rotation, translation, vibration) ($\Delta G_{\text{mouvement}}$) (Pantsar et Poso, 2018).

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{solvant}} + \Delta G_{\text{conf}} + \Delta G_{\text{int}} + \Delta G_{\text{motion}}$$

1.4. Types de liaisons entre le récepteur et le ligand

Il existe de nombreuses affinités entre le substrat et l'enzyme, comme les interactions ioniques, la liaison hydrogène, l'interaction hydrophobe, la force de Van der Waals.

a. Liaison hydrogène : la liaison hydrogène est formée par un atome d'hydrogène attaché à un atome hautement électronégatif, comme l'oxygène et l'azote, jouant un rôle vital dans le maintien de la stabilité des interactions (Cleland, 2010).

La liaison hydrogène est classée en conventionnelle et non conventionnelle en fonction de l'électronégativité des atomes donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène. Les liaisons hydrogène conventionnelles comprennent des atomes avec une électronégativité plus élevée, par exemple O, N et F. Les liaisons hydrogène conventionnelles incluent N-H...N, O-H...O,

N-H...O, etc. Les liaisons non conventionnelles comprennent les liaisons hydrogène ayant des atomes donateurs ou accepteurs ou les deux ayant moins d'électronégativité comprend C-H...O, C-H...F, C-H...N, O-H...S, N-H...S (Mishra, 2019).

b. Interactions ioniques (électrostatiques) : les interactions ioniques impliquent l'attraction d'ions ou de molécules de charge opposée, et constituent une force puissante entre les molécules dans les interactions électrostatiques. Par exemple, les interactions ioniques peuvent maintenir la thermostabilité des protéines (Vetriani *et al.*, 1998).

c. La force de Van der Waals : ces interactions appartiennent aux forces répulsives ou attractives entre entités moléculaires différentes de la formation de liaisons ioniques (Nic *et al.*, 2012).

d. Interactions hydrophobes : les interactions hydrophobes, qui représentent les relations entre les hydrophobes et l'eau, sont des interactions plus faibles entre les molécules ou les molécules internes. Les hydrophobes, généralement composés de longues chaînes de carbone qui n'ont pas interagi avec les molécules d'eau, sont des molécules non polaires. Les interactions hydrophobes sont également importantes pour la stabilité de la structure spatiale et de l'activité biologique, car la surface hydrophile des protéines devient petite et cela diminue les mauvaises interactions avec l'eau (Atkins et De Paula, 2011).

L'existence d'une liaison Pi-Soufre aide à l'intercalation du ligand dans le site de liaison. D'autres types de liaisons telles que les liaisons alkyle, Pi-Pi et Pi-alkyle aident à améliorer l'interaction hydrophobe du ligand dans la poche de liaison du récepteur (Arthur et Uzairu, 2019).

1.5. Etape du docking moléculaire

Dans ce processus, la macromolécule est le récepteur de la protéine. La molécule est le ligand qui peut agir comme un inhibiteur. Le processus de docking comprend donc les étapes suivantes :

Etape 1 : Préparation de la protéine

La structure tridimensionnelle de la protéine doit être récupérée dans la banque de données des protéines (PDB) ; la structure cible doit être déterminée expérimentalement, généralement par cristallographie aux rayons X ou par résonance magnétique nucléaire (RMN) si la structure n'est pas trouvée dans la banque ; toutefois, le docking peut être réalisé avec succès par rapport aux modèles d'homologie (Shoichet *et al.*, 2002).

Après avoir sélectionné le modèle, les structures cristallines des protéines sont préparées avant le docking afin d'ajouter des atomes d'hydrogène, d'optimiser les liaisons d'hydrogène, de supprimer les collisions atomiques, et d'effectuer d'autres opérations qui ne font pas partie du processus de raffinement de la structure cristalline par rayons X (Sastry *et al.*, 2013), ainsi l'élimination des molécules d'eau, stabiliser les charges, remplir les résidus manquants, générer les chaînes latérales selon les paramètres disponibles (Chaudhary et Mishra, 2016).

Etape 2 : Prédiction du site actif

Après la préparation de la protéine, le site actif doit être prédit. Le récepteur peut posséder de nombreux sites actifs, il suffit de choisir celui qui est le plus important (Schnecke et Kuhn, 2000).

Etape 3 : Préparation de ligands

Le type de ligands choisi pour le docking dépend de l'objectif. Il peut être obtenu à partir de diverses bases de données, par exemple PubChem (Dias *et al.*, 2008). Il est souvent nécessaire d'appliquer des filtres pour réduire le nombre de molécules à docker. Il s'agit par exemple du poids moléculaire, de la surface polaire, de la solubilité, de la disponibilité commerciale, des seuils de similarité, des pharmacophores, de l'accessibilité synthétique et des propriétés d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicologie (Hernández-Santoyo *et al.*, 2013).

Etape 4 : Processus de docking

Il s'agit de la dernière étape, où le ligand est amarré au récepteur et les interactions sont vérifiées. La fonction de notation génère un score en fonction du meilleur ligand sélectionné. Il existe de nombreux algorithmes pour évaluer et rationaliser les interactions ligand-protéine ou protéine-protéine, et leur nombre ne cesse d'augmenter. Plusieurs algorithmes partagent des méthodologies communes avec de nouvelles extensions visant à obtenir une méthode robuste avec une précision aussi élevée que possible (Hernández-Santoyo *et al.*, 2013). Les programmes de docking les plus courants comprennent AutoDock, DOCK, FlexX, GOLD, ICM (Tableau 3).

Tableau 3. Les programmes de docking moléculaire les plus utilisés (Morris et Lim-Wilby, 2008).

Programme de docking	Outil complémentaire	Format de fichier
AutoDock 4	AutoGrid, ADT, BDT	Mol2, PDBQT
Auto Dock Vina	Chimera	Mol2
DOCK 6	Grid, Docktools, Nchemgrids, Sphgen, ANTECHAMBER	Mol2
FlexX 2	FlexV	Mol2, SD
GOLD 3	GOLD Front End, SILVER	Mol2, SD
ICM 3.4	ICM-Pro, ICM-VLS	Mol2, SD

Etape 5 : Evaluation de résultat

Le succès des algorithmes de docking dans la prédiction de la pose de liaison d'un ligand est normalement mesuré en termes d'écart quadratique moyen (RMSD) entre les positions des atomes lourds des ligands observées expérimentalement et celles prédites par l'algorithme (Sousa *et al.*, 2006). La flexibilité du système est un défi majeur dans la recherche de la pose correcte. Le nombre de degrés de liberté inclus dans la recherche conformationnelle est un aspect central qui détermine l'efficacité de la recherche. On considère généralement qu'une bonne performance est obtenue lorsque la RMSD est inférieure à 2Å (Hernández-Santoyo *et al.*, 2013).

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_{ci} - x_{di})^2 + (y_{ci} - y_{di})^2 + (z_{ci} - z_{di})^2}$$

Où

N est le nombre d'atomes dans le ligand, ci et di représentent les distances entre les atomes de deux macromolécules superposées ; X, Y et Z sont les dimensions (localisation) des atomes.

2. Modélisation moléculaire

2.1. Généralités sur la structure des protéines

Les protéines sont des chaînes linéaires d'acides aminés qui adoptent une structure tridimensionnelle unique dans leur environnement natif. C'est structure native qui permet à la protéine de remplir sa fonction biochimique (Floudas *et al.*, 2006).

Chaque acide aminé se compose d'un atome de carbone central (α -carbone), d'un groupe amino, NH_2 , d'un groupe carboxyle, COOH et d'une chaîne latérale (Ferrier, 2014). Ils diffèrent les uns des autres par leurs chaînes latérales, et par conséquent on a 20 acides aminés selon, taille, charge et polarité (Chandra et Tyagi, 2013).

La structure primaire est constituée d'une chaîne linéaire d'acides aminés (Figure 15) (Sanvictores et Farci, 2020). La structure primaire est la base des structures de niveau supérieur et des fonctions protéiques, en fournissant toujours la base pour l'étude et la modélisation des modèles protéiques, des modèles de mutations naturelles et artificielles, de la similitude au sein d'une famille de protéines, de la similitude entre familles de protéines, et de la base topologique des structures de niveau supérieur (Wu et Yan, 2002).

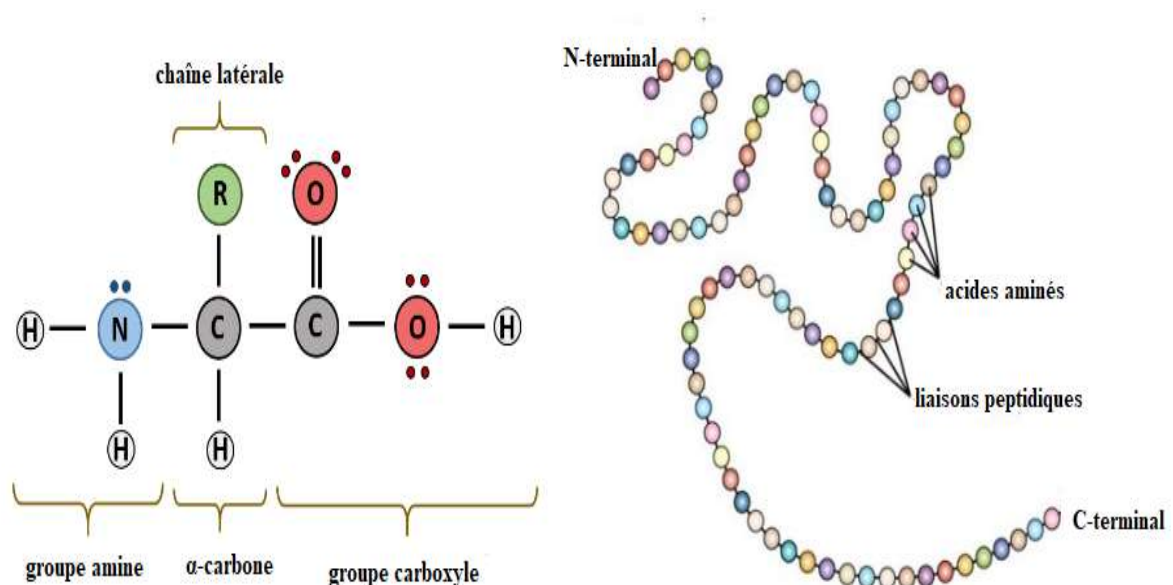


Figure 15. Structure primaire des protéines (site web5 :

<https://wou.edu/chemistry/courses/online-chemistry-textbooks/ch450-and-ch451-biochemistry-defining-life-at-the-molecular-level/chapter-2-protein-structure/>).

Le niveau suivant de la structure de la protéine, la structure secondaire, fait référence aux structures repliées locales qui se forment dans un polypeptide en raison des interactions entre les atomes du squelette. Les types les plus courants de structures secondaires sont les hélices α et les feuilles plissées β . Les deux structures sont maintenues en forme par des liaisons hydrogène, qui se forment entre le carbonyle O d'un acide aminé et la fonction amine H d'un autre acide aminé (Rehman *et al.*, 2017) (Figure 16).

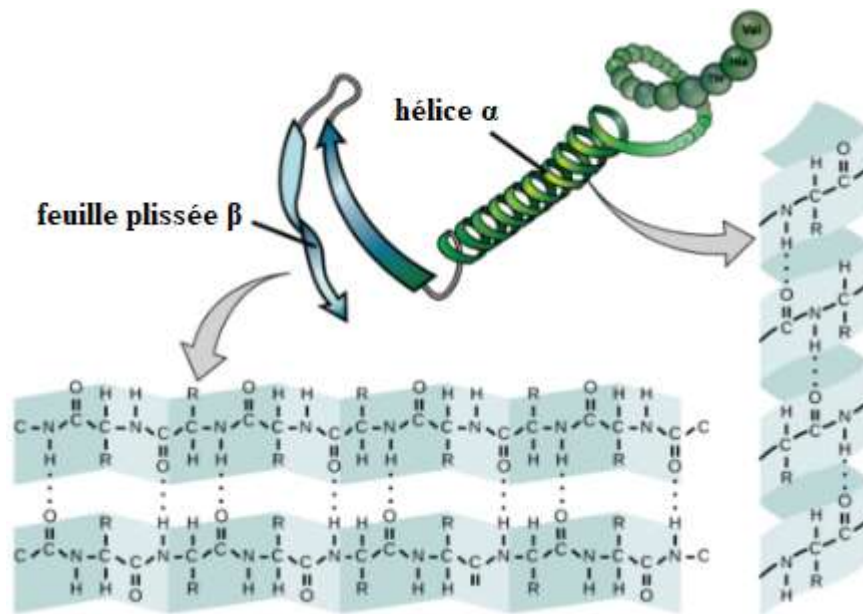


Figure 16. Structure secondaire des protéines (Daudert, 2018)

Il a été observé que la structure secondaire prédite est utile dans la prédiction de des plis protéiques et dans la prédiction de la fonction. Il a également été observé que l'angle dièdre (ou angle de torsion du squelette) et les structures secondaires d'une protéine sont fortement corrélés (Singh *et al.*, 2014).

La conformation du squelette de chaque résidu d'acide aminé non terminal est déterminée par trois angles de torsion, traditionnellement appelés Phi ϕ , Psi ψ et Omega ω (Kleywegt, 2000).

Dans le graphique de Ramachandran, l'angle Phi mesure la rotation autour de la liaison carbone-azote, Psi mesure la rotation autour de la liaison carbone-carbone. Les angles phi-psi se regroupent généralement autour de $\phi = -60^\circ$, $\psi = -40^\circ$ pour l'hélice D, $\phi = -120^\circ$, $\psi = 120^\circ$ pour le brin bêta, et autour de $\phi = 60^\circ$, $\psi = 40^\circ$ pour l'hélice L. L'angle dièdre oméga ω est presque fixé à 180° (forme trans) et rarement à 0° (forme cis) en raison de la planéité de la liaison dipeptide partielle (Figure 17) (Singh *et al.*, 2014).

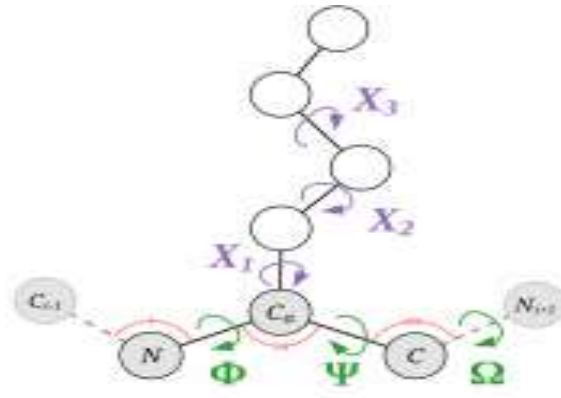


Figure 17. Les trois types des angles de torsion (King et Koes, 2020)

La structure tertiaire, le niveau de structure immédiatement supérieur, fait référence à la conformation globale d'une chaîne polypeptidique, c'est-à-dire à l'arrangement tridimensionnel de tous les résidus d'acides aminés (Chou et Fasman, 1978).

Contrairement à la structure secondaire, qui est stabilisée par des liaisons hydrogène, la structure tertiaire est stabilisée par des interactions hydrophobes entre les chaînes latérales non polaires et, dans certaines protéines, par des liaisons disulfures. Ces forces de stabilisation maintiennent les hélices, les brins, les spires et les bobines aléatoires dans un échafaudage interne compact. Ainsi, la taille et la forme d'une protéine dépendent non seulement de sa séquence, mais aussi du nombre, de la taille et de la disposition de ses structures secondaires. Pour les protéines constituées d'une seule chaîne polypeptidique, les protéines monomères, la structure tertiaire est le plus haut niveau d'organisation (Lodish *et al.*, 2000).

La structure quaternaire est l'interaction de deux ou plusieurs chaînes polypeptidiques repliés. De nombreuses protéines nécessitent l'assemblage de plusieurs sous-unités polypeptidiques avant de devenir actif. Si la protéine finale est constituée de deux sous-unités, la protéine est dite un dimère. Si trois sous-unités doivent se réunir, la protéine est dite trimère, quatre sous-unités constituent un tétramère, etc. Si les sous-unités sont identiques, le préfixe « homo » est utilisé, comme dans "homodimère". Si les sous-unités sont différentes, le préfixe est « hétéro », comme dans « hétérodimère » (Perera et Peiris, 2020).

2.2. Méthodes *in silico* de la modélisation d'une structure protéique

Pour trouver la structure native des protéines, les principes physico-chimiques ainsi que l'identification des états d'énergie libre les plus bas sont considérés comme les meilleures propriétés. Destinées à prédire des protéines cibles avec des structures inconnues, les

méthodes basées sur la bioinformatique ont remporté un succès considérable (**Roy et Zhang, 2012**).

Les étapes critiques des méthodes basées sur la bio-informatique impliquent des alignements de séquence cible (requête)-modèle, la reconnaissance de pli, un assemblage structural basé sur des fragments et de multiples raffinements structuraux basés sur un modèle (**Farhadi, 2018**).

Prédire la structure de la protéine à partir de sa séquence d'acides aminés est l'un des problèmes les plus difficiles dans le domaine de la biologie computationnelle. La modélisation basée sur des modèles (TBM en anglais « template-based modeling ») est une méthode populaire pour la prédiction de la structure tertiaire des protéines. TBM prédit la structure d'une protéine requête (appelée cible) en l'alignant sur un ou plusieurs modèles avec des structures résolues (**Wu et Xu, 2021**).

Les méthodes de prédiction de la structure des protéines ont été principalement classées en trois types : repliement ab initio, modélisation comparative (homologie) et enfilage (**Roy et Zhang, 2012**).

2.2.1. Méthode ab initio

Cette procédure a reçu des noms différents, par ex. modélisation ab initio, modélisation de novo, modélisation basée sur la physique ou la modélisation libre (**Lee et al., 2017**).

La prédiction ab initio de la structure native d'une protéine à partir de ses informations de séquence est l'un des problèmes les plus difficiles de la biophysique computationnelle car elle se base uniquement sur les informations de séquence et sans utiliser de modèles (**Lee et al., 2011**).

La conception de la protéine « de novo » décrit la génération de nouvelles protéines avec des séquences sans rapport avec celles de la nature basée sur des principes physiques d'interactions intramoléculaires et intermoléculaires (**Pan et Kortemme, 2021**).

Parmi les programmes plus utilisés sont : CHARMM, AMBER et ECEPP, ces dernières donnent plus de fiabilité, de précision, de convivialité et de flexibilité pour vérifier la divergence fonctionnelle d'une protéine (**Hoque et al., 2009**).

2.2.2. Modélisation comparative

En l'absence d'une structure protéique tridimensionnelle, la modélisation d'homologie est un outil puissant pour prédire la structure 3D des protéines (Vyas *et al.*, 2012).

Dans la modélisation comparative, la structure d'une protéine est prédite en comparant sa séquence d'acides aminés à des séquences pour lesquelles la structure tridimensionnelle native est déjà connue. La modélisation comparative est basée sur l'observation que la similarité de séquence implique une similarité structurale. La précision des prédictions par modélisation comparative dépend fortement du degré de similarité de séquence (Floudas *et al.*, 2006).

Si la cible et le modèle partagent plus de 50% de leur séquence, les prédictions sont généralement de haute qualité. Alors que pour moins de 30% d'identité de séquence, la prédiction est susceptible de contenir des erreurs significatives (Kopp et Schwede, 2004).

Cette méthodologie est basée sur le principe général que les protéines avec des séquences similaires ont des structures tertiaires similaires. Récemment, un certain nombre de programmes et de serveurs tels que MODELLER, SWISS-MODEL, RAMP, PrISM, COMPOSER, CONGEN+2 et DISGEO/Consensus ont été développés pour construire un modèle 3D complet (Chahal *et al.*, 2020).

2.2.3. Méthode d'enfilage

La reconnaissance de pli, souvent appelée « threading », correspond au cas où une ou plusieurs structures (modèles) similaires à une séquence cible donnée existaient dans la PDB mais ne sont pas facilement identifiables (Petrey et Honig, 2005).

Les méthodes de reconnaissance des plis sont une classe de méthodes qui visent à prédire la structure pliée tridimensionnelle des séquences d'acides aminés pour lesquelles les méthodes de modélisation comparative ne fournissent aucune prédiction fiable (Floudas *et al.*, 2006).

L'enfilage des protéines peut être utilisé à la fois pour la prédiction de la structure et la reconnaissance du repliement des protéines, c'est-à-dire la détection de protéines homologues. De nombreux programmes ont été proposés pour la prédiction de la structure des protéines, basés sur le threading tels que : FUGUE, 3D-PSSM et Gen THREADER (Xu *et al.*, 2003).

L'enfilage des protéines prédit la structure tridimensionnelle d'une nouvelle protéine (c'est-à-dire la cible) en alignant sa séquence primaire sur une structure expérimentale similaire (c'est-à-dire le modèle) dans la PDB (**Peng et Xu, 2009**).

2.3. Etapes de la modélisation comparative

Le développement du modèle par modélisation homologue est un processus qui se déroule en plusieurs étapes, qui peut être résumé de la manière suivante (1) identification du template ; (2) alignements de séquences ; (3) la construction d'un modèle pour la cible sur la base de la structure 3D du template ; (4) affinement du modèle, analyse des alignements et (5) validation du modèle (**Joo et al., 2011**).

2.3.1. Identification du template (matrice)

C'est l'étape initiale dans laquelle le programme/serveur compare la séquence de structure inconnue avec la structure connue stockée dans PDB. Le serveur le plus populaire est BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Une recherche avec BLAST dans la base de données pour des alignements locaux optimaux avec la requête, donne une liste de structures protéiques connues qui correspondent à la séquence. BLAST ne peut pas trouver de matrice lorsque l'identité de séquence est bien inférieure à 30% (**Vyas et al., 2012**).

Dans le cas d'une faible homologie (inférieure à 30 % d'identité de séquence), des méthodes alternatives sont utilisées pour l'alignement afin de réduire les décalages et les écarts tels que les alignements profil-profil, les modèles de Markov cachés (HMM) et la position BLAST itéré spécifique (psi-BLAST). Une identité de séquence très faible entraînera de fausses affectations de repliement en raison d'erreurs d'alignement résultant d'un plus grand nombre de mutations (**Hameduh et al., 2020**).

2.3.2. Alignements de séquences

Une fois les alignements les plus appropriés sélectionnés, les alignements et leur correction au cas où cela serait nécessaire sont entrepris. Les alignements sont target-template et template-template lorsque plusieurs modèles sont utilisés. L'erreur dans l'alignement d'un résidu provoque le déplacement du carbone. Un seul intervalle de résidus dans une section d'hélice déclenche la rotation du reste des résidus dans l'hélice. En conséquence, l'alignement

des séquences dans le bon sens est crucial dans la modélisation d'homologie (**Muhammed et Aki-Yalcin, 2019**)

2.3.3. Construction d'un modèle pour la cible sur la base de la structure 3D de la matrice

Après l'alignement cible-template, l'étape suivante de la modélisation d'homologie est la construction du modèle.

L'original et la méthode encore largement utilisée est la construction par assemblage de corps rigides. Cette méthode construit le modèle à partir de quelques régions centrales et de boucles et chaînes latérales, qui sont obtenues à partir de la dissection des structures apparentées (**Fiser, 2010**).

Un autre type de méthodes, la construction par correspondance de segments, s'appuie sur les positions approximatives des atomes conservés à partir des modèles pour calculer les coordonnées d'autres atomes. Le troisième, la construction par satisfaction des contraintes spatiales, utilise soit la géométrie de la distance, soit des techniques d'optimisation pour satisfaire les contraintes spatiales obtenues à partir de l'alignement de la séquence cible avec les structures matrices (**Hameduh et al., 2020**).

Les programmes disponibles pour la modélisation d'homologie sont Modeller, *Swiss-PdbViewer* et *Swiss-Model* (**Malathi et Ramaiah, 2018**).

2.3.4. Affinement du modèle, analyse des alignements, suppressions et ajouts de lacunes

Le raffinement du modèle est basé sur le réglage de l'alignement, la modélisation des boucles et des chaînes latérales. Le processus de raffinement du modèle commencera généralement par une étape de minimisation de l'énergie afin de stabiliser la structure (**Xiang, 2006**).

Les protéines homologues présentent des lacunes ou des insertions dans les séquences, appelées boucles dont les structures ne sont pas conservées au cours de l'évolution. Les boucles contribuent aux sites actifs. La précision de la modélisation en boucle est un facteur majeur pour déterminer l'utilité des modèles d'homologie pour l'étude des interactions protéine-ligand (**Lee et al., 2010**).

Les structures en boucle sont plus difficiles à prédire que la structure des feuillets et des hélices géométriquement très régulières car les boucles présentent une plus grande variabilité structurale que les feuillets et les hélices. La longueur d'une région de boucle est généralement beaucoup plus courte que celle de la chaîne protéique entière. La modélisation d'une région en boucle présente des défis, qui ne sont probablement pas présents dans la structure globale de la protéine. La structure de boucle modélisée doit être géométriquement cohérente avec le reste de la structure de la protéine (Vyas *et al.*, 2012).

2.3.5. Validation du model

La qualité du modèle prédit détermine les informations qui peuvent en être extraites. Il existe de nombreux programmes et serveurs d'évaluation de modèles. La première étape de l'évaluation du modèle consiste à déterminer si le modèle a le bon pli et si ce modèle est aligné au moins approximativement correctement avec la séquence cible (Sippl, 1993).

La confiance dans le pli d'un modèle est généralement augmentée par une similitude de séquence élevée avec le modèle le plus proche, un Z-score significatif basé sur l'énergie et la conservation des résidus fonctionnels ou structurels clés dans la séquence cible, il est défini comme la séparation d'énergie entre le pli natif et la moyenne d'un ensemble de mauvais plis dans les unités de l'écart type de l'ensemble (Zhang et Skolnick, 1998).

Une fois que le pli d'un modèle est accepté, une évaluation plus détaillée de la précision globale du modèle peut être obtenue sur la base de la similitude entre les séquences cible et matrice. Une identité de séquence supérieure à 30 % est un prédicateur relativement bon de la précision attendue. Si l'identité de séquence cible-matrice tombe en dessous de 30 %, l'identité de séquence devient peu fiable en tant que mesure de la précision d'un modèle unique (Mishra, 2013).

La validation vérifie aussi les longueurs de liaison, les angles de liaison, la planéité des liaisons peptidiques et des chaînes latérales, les angles de torsion de la chaîne principale et des chaînes latérales et les affrontements entre les paires d'atomes non liées ; cette évaluation est basée sur plusieurs paramètres (Mishra, 2013).

a) DOPE (Discrete optimized protein energy) : c'est l'énergie protéique discrète optimisée, est basé sur un état de référence physique amélioré qui correspond à des atomes sans interaction dans une sphère homogène dont le rayon dépend d'une structure native de l'échantillon (Jing et Dong, 2017).

b) RMSD (Root Mean Square Deviation) : c'est une déviation quadratique moyenne signifiant la mesure quantitative la plus couramment utilisée de la similitude entre deux coordonnées atomiques superposées (**Kufareva et Abagyan, 2011**).

c) QMEAN (Qualitative Model Energy ANalysis) : est une fonction de notation décrivant les principaux aspects géométriques de la structure secondaire de la protéine prédite (**Benkert et al., 2008**).

d) Z-Score : le score Z d'une protéine est défini comme la séparation énergétique entre le pli natif et la moyenne d'un ensemble de mauvais plis dans les unités de l'écart type de l'ensemble (**Zhang et Skolnick, 1998**). Le z-score indique la qualité globale du modèle et mesure l'écart de l'énergie totale de la structure par rapport à une distribution d'énergie dérivée de conformations aléatoires (**Wiederstein et Sippl, 2007**).

D'un autre côté, la validation des structures prédites est essentielle car chaque modèle contient des erreurs. En utilisant des différents outils de validation des modèles d'homologie à savoir PROCHECK, ERRAT, VERIFY3D.

a) PROCHECK vérifie la qualité stéréochimique d'une structure protéique en analysant la géométrie résidu par résidu et sur toute la géométrie de la structure (**Dhurigai et al., 2014 ; Skariyachan et Garka, 2018**).

b) ERRAT analyse les statistiques des interactions non liées entre différents types d'atomes et trace la valeur de la fonction d'erreur en fonction de la position d'une fenêtre glissante à 9 résidus, calculée par comparaison avec les statistiques de structures hautement raffinées (**Dhurigai et al., 2014 ; Skariyachan et Garka, 2018**).

c) VERIFY3D détermine la compatibilité d'un modèle atomique (3D) avec sa propre séquence d'acides aminés (1D) en attribuant une classe structurale en fonction de son emplacement et de son environnement (alpha, bêta, boucle, polaire, non polaire, etc.) (**Dhurigai et al., 2014**).

3. Simulations de la dynamique moléculaire (SDM)

Les simulations de la dynamique moléculaire prédisent comment chaque atome d'une protéine se déplacera au fil du temps sur la base d'un modèle général de la physique régissant des interactions interatomiques (**Karplus et McCammon, 2002**). Ces simulations peuvent capturer une grande variété de processus biomoléculaires importants, y compris le changement de conformation, la liaison de ligands et le repliement des protéines. Il est important de noter que ces simulations peuvent également prédire comment les biomolécules

réagiront, au niveau atomique, à des perturbations telles que la mutation, la phosphorylation, ou l'ajout ou le retrait d'un ligand (Hollingsworth et Dor, 2018).

La SMD est couramment appliquée pour l'étude des propriétés dynamiques et des processus dans le domaine de la biochimie structurale, de la biologie moléculaire, de la science pharmaceutique et de la biotechnologie. Cet outil aide les chercheurs à générer une trajectoire de macromolécules telles que des protéines, c'est-à-dire qu'il génère une progression de la structure simulée par rapport au temps (Singh *et al.*, 2018).

La SMD nécessite quelques choix : 1) Quel matériel informatique utiliser ? Les unités de traitement graphiques GPU sont devenus un choix particulièrement attrayant car ils effectuent des simulations rapides à un coût modeste, mais les simulations sont également exécutées sur des supercalculateurs, qui peuvent être plus rapides, ainsi que sur des unités centrales de traitement (CPU) traditionnelles, qui peuvent être plus facilement disponibles. 2) Quel champ de force utiliser ? Les choix les plus courants sont les différentes versions d'AMBER, CHARMM, NAMD et OPLS (Tableau 4) (Hollingsworth et Dror, 2018).

Tableau 4. Les différents types de champ de force (Chen *et al.*, 2019).

Famille de champ de force	Classes moléculaires couramment applicables
GROMACS	Protéines, glucides, lipides (membranaires)
NAMD	Protéines
CHARMM	Protéines, glucides, lipides (membranaires)
AMBER	Protéines, glucides, lipides
CFF	Protéines, glucides, lipides
DREIDING	Protéines, glucides
OPLS	Protéines, glucides, lipides
CVFF	Protéines, glucides
MMFF	Protéine, complexe protéine-ligand, glucides
GLYCAM	Glucides, glycoprotéine
CSFF	Protéines, glucides

Avant d'effectuer la simulation, il faut préparer le système moléculaire en y intégrant les atomes manquants (y compris les atomes d'hydrogène, qui ne sont généralement pas résolus dans les structures cristallines), en ajoutant des molécules "solvants" telles que l'eau, les ions

de sel (pour une membrane protéine) et lipides, et l'attribution de paramètres de champ de force. La plupart des logiciels de simulation courants incluent des logiciels pour la préparation du système, et un certain nombre de logiciels récemment introduits ou améliorés simplifient le processus de préparation (Jo *et al.*, 2008 ; Salsbury, 2010).

L'analyse des résultats de la simulation MD peut être difficile pour plusieurs raisons. Ces simulations produisent une grande quantité de données ; une simulation typique pourrait suivre les positions et les vitesses de 100 000 atomes sur des milliards de pas de temps. Il est difficile d'identifier les aspects les plus pertinents et biologiquement importants de ces données. Dans certains cas, on ne s'intéresse qu'à une quantité particulière bien définie, telle que l'énergie d'interaction entre un ligand et une protéine (Hollingsworth et Dror, 2018).

L'analyse des résultats de la simulation s'effectue sur la base de quelques paramètres comme :

- a) **Le RMSD** pour trouver le déplacement moyen des atomes à un instant de la simulation par rapport à une structure de référence, généralement la première trame de la simulation (Martínez, 2015).
- b) **Le RMSF** pour mesurer le déplacement d'un atome particulier, ou d'un groupe d'atomes, par rapport à la structure de référence. Lorsqu'une simulation est équilibrée, c'est-à-dire lorsque la structure d'intérêt fluctue autour d'une conformation moyenne stable, il est logique de calculer les fluctuations de chaque sous-ensemble de la structure (chaque atome, par exemple) par rapport à la structure moyenne de la simulation (Martínez, 2015).
- c) **Le rayon de giration (Rg)** qui est un paramètre fondamental de la structure moléculaire. Rg est défini comme la distance quadratique moyenne du centre de la molécule (Tanner, 2016).
- d) **Surface accessible aux solvants (SASA)** est la surface accessible aux solvants des protéines qui a toujours été considérée comme un facteur décisif dans les études de repliement et de stabilité des protéines. Elle est définie comme la surface caractérisée autour d'une protéine par un centre hypothétique d'une sphère de solvant avec la surface de contact van der Waals de la molécule (Ausaf *et al.*, 2014).

Matériel et Méthodes

« La connaissance s'acquiert par l'expérience »

D'Albert Einstein

Partie 1. Criblage *in vitro* de l'activité antifongique contre le phytopathogène *Alternaria* sp.

1. Echantillonnage de sol d'étude

Les échantillons du sol ont été prélevés de trois sols agricoles de la Wilaya d'Oum El Bouaghi à savoir ; les communes de Ain Beida, Oum El Bouaghi et Ain Fakroun (altitude 891 m, humidité moyenne 57,3 %, température moyenne annuelle 18°C, précipitation totale annuelle 508,25 mm de l'année 2019-2020).

L'échantillonnage est effectué en Mars 2020. Pour chaque sol, un échantillon représentatif a été prélevé en ciblant au hasard différents endroits de la parcelle choisie. Les débris de surface ont tout d'abord été éliminés et environ 10 g de chaque sol d'une profondeur de 10 cm sous la surface a été mis dans un sac en plastique stérile. Les sacs ont été amenés au laboratoire où ils sont conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

2. Isolement des microorganismes antagonistes

Dans notre étude, on s'est focalisé sur l'isolement des deux groupes microbiens champignons et actinomycètes. L'isolement a été effectué selon la méthode de suspension-dilution. Dans des conditions d'aseptise, 1 g de sol a été prélevé de chaque échantillon et transféré dans un tube contenant 9 mL d'eau physiologique stérile, puis agités sur un vortex pendant 5 min pour obtenir une solution mère homogène. Une série de dilution est ensuite préparée par des prélèvements successifs de 1 mL jusqu'à produire la dilution 10^{-6} . Un volume de 0,1 mL est utilisé dans un ensemencement en surface pour inoculer les milieux PDA et ISP2 pour l'isolement des deux groupes microbiens mycètes et actinomycète, respectivement. Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 7 à 15 jours. Les différents types de colonies microbiennes apparues sur les milieux ont été sélectionnées et réensemencées dans les mêmes conditions précédentes jusqu'à leur purification (**Rahman *et al.*, 2012**).

3. Isolement des champignons phytopathogènes

Vu l'ampleur des dégâts qu'il cause sur la culture de tomates, l'agent responsable de l'alternariose *Alternaria* a été choisi comme model dans l'étude de l'antagonisme.

Des tomates présentant les symptômes d'infection caractéristique de la maladie d'alternariose ont été récupérées à partir de différentes régions (Ain Beida, Oum El Bouaghi, et Constantine). Les tomates infectées portent des lésions enfoncées brun foncé avec des anneaux concentriques caractéristiques (**Figure 18**).



Figure 18. Photo de tomates présentant des symptômes d'alternariose

Les fruits infectés ont été lavés à l'eau du robinet pour enlever les débris, puis les parties infectées sont coupées en petits morceaux, et sont trempés dans une solution de l'hypochlorite de sodium (2%) pendant deux minutes et dans une solution d'alcool 70% pendant une minute pour la stérilisation de surface. Ces parties ont ensuite été lavées trois fois avec l'eau distillée stérile, séchées entre papier filtre stérile, puis placées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 7 jours avec une observation quotidienne. Après les jours d'incubation, les isolats appartenant au genre d'*Alternaria* confirmés par l'observation macroscopique et microscopique sont repiqués sur le milieu PDA pour avoir une culture pure (Hammami *et al.*, 2013).

4. Criblage in vitro de l'activité antifongique

L'activité antifongique des microorganismes isolés du sol contre les souches phytopathogènes d'*Alternaria* a été déterminée par la technique de double culture, appelée aussi la technique de confrontation directe. Un total de 30 isolats d'actinomycète et 68 isolats de moisissure a été sélectionné pour des tests in vitro.

Un agent antagoniste et un agent pathogène sont inoculés dans la même boîte de Pétri à la même distance du centre de la boîte. Dans le cas des souches fongiques, des cylindres d'agar de 5 mm de diamètre ont été prélevés des cultures âgées de 7 jours est déposé sur la boîte de Pétri. Alors que pour les actinomycètes un ensemencement en trait a été effectué. De l'autre côté, un cylindre d'agar de 5mm de diamètre de l'agent phytopathogène âgé de 7 jours a été déposé du côté opposé du premier cylindre à une distance de 30 mm. Les boîtes ont ensuite mis à l'incubation à 30°C pendant 7 jours. Des boîtes inoculées uniquement avec l'agent pathogène ont été utilisé comme témoin. Chaque test biologique en double culture agent antagoniste/pathogène a été mis en place en triple exemplaire (Pellan *et al.*, 2020 ; Gao *et al.*, 2020) (Figure 19).

Le pourcentage d'inhibition de la croissance radiale (PIRG) a été calculé après sept jours de croissance en utilisant la formule de **Skidmore et Dickinson (1976)** :

$$PIRG = (R_1 - R_2) / R_1 \times 100.$$

- R₁ : diamètre de phytopathogène en absence de l'antagoniste.
- R₂ : diamètre de phytopathogène en présence de l'antagoniste.



Figure 19. Schéma représentant la technique de la confrontation directe (**Rahman et al., 2009**).

Les pourcentages d'inhibition de la croissance radiale étaient classés de faible à très élevée activité antifongique selon les limites suivantes :

<30% : faible activité antifongique ; 30 - 50% : activité antifongique modérée ; 50 - 70% : activité antifongique élevée ; ≥70% : activité antifongique très élevée.

Les souches actinomycétales/fongiques présentant une activité antifongique élevée et très élevées ont été sélectionnées pour les études ultérieures.

5. Caractérisation des isolats antagonistes sélectionnés

Les souches antagonistes qui ont montré une activité antifongique importante dans le test de confrontation direct ont fait l'objet d'une caractérisation micro-macroscopique et biochimique.

5.1. Caractérisation macroscopique

L'identification des genres fongiques et actinomycétales ont été réalisées par analyse des caractéristiques macroscopiques liées à chaque souche : texture de la colonie, couleur, production de pigment, taille, temps de croissance...etc. Toutes les caractéristiques ont été enregistrées et évaluées pour être potentiellement important pour la classification des lignées microbiennes.

La caractérisation macroscopique des antagonistes est réalisée sur les milieux PDA et Sabouraud pour les champignons et sur les milieux ISP2 (gélose à extrait de levure et extrait de malt), ISP3 (gélose à l'avoine), ISP4 (Gélose à l'amidon et au sel minéral), ISP5 (gélose à

Base de l'asparagine et au glycérol), ISP7 (gélose à base de tyrosine) et Bennet pour les Actinomycètes (**Annexe 1**) (**Saif et al., 2021 ; Dahdah et al., 2021**).

5.2. Caractérisation microscopique

L'identification microscopique des antagonistes fongiques sélectionnés ont été réalisées en utilisant le bleu de coton de lactophénol. Une goutte de ce colorant a été placée sur une lame de verre propre puis une partie du mycélium était transféré sur la lame à l'aide de ruban adhésif. La lamelle est ensuite examinée sous des grossissements faible et fort en utilisant une lumière très réduite (**Parmar et al., 2018**).

Pour les antagonistes actinomycétales, une coloration de Gram a été tout d'abord réalisée. L'observation microscopique des actinomycètes est aussi caractérisée par la technique de culture sur lamelle. Cette technique consiste à insérer une lamelle stérile dans un milieu gélosé, de telle sorte qu'elle forme un angle égal à 45° avec la surface de milieu de culture. Une goutte de suspension sporale est déposée contre la lamelle en contact avec le milieu. Après 14 jours d'incubation à 30°C, la lamelle est retirée délicatement de la gélose, entraînant avec elle des fragments des mycéliums de substrat et aérien. Elle est ensuite déposée sur une lame propre contenant une goutte de rose de Fushine, puis examinée au microscope optique (G x 100) (**Rachedi et al., 2018**).

5.3. Caractérisation de l'activité enzymatique

Pour évaluer la capacité des souches antagonistes potentielles à produire des enzymes hydrolytiques, les isolats sélectionnés ont été examinés en utilisant différents milieux de culture.

5.3.1. Activité protéolytique

Pour le criblage des protéases, les souches ont été cultivées sur un milieu de culture à base de lait écrémé. Le milieu a été transféré de manière aseptique dans des boîtes de Pétri et inoculé soit avec un disque de gélose de 6 mm coupé d'une culture fongique âgée de 5 jours ou par une ligne droite pour les souches actinomycétales bien sporulé (7 jours) et incubé à 30°C pendant 3 à 5 jours. La zone claire présente autour de colonie indique une activité protéolytique (**Chandra et al., 2021**). L'indice enzymatique relatif (diamètre de la zone/diamètre de la colonie) a été calculé.

5.3.2. Activité cellulolytique

Pour identifier l'activité de production de cellulase, un milieu de base additionné de 1% de carboxyméthylcellulose (CMC) est utilisé. Après l'ensemencement par un disque de gélose de 5 mm pour les champignons et une ligne droite pour les actinomycètes, les échantillons ont

été incubés pendant 3 à 5 jours à 30°C (Carvalho *et al.*, 2021). Après l'incubation les boîtes ont été inondées par la solution d'iode (Annexe 1) pendant 2 à 3 minutes. Les zones claires sont observées autour les colonies indiquent la production de cellulase (Kasana *et al.*, 2008). L'indice d'activité enzymatique était calculé par le rapport diamètre de zone claire diamètre de la colonie.

5.3.3. Activité amylasique

L'activité amylasique est déterminée par l'utilisation d'un milieu gélosé à base d'amidon. Les souches antagonistes sélectionnées sontensemencées et incubées pendant 3 à 5 jours à 30°C. Les zones claires sont révélées par l'addition de solution iodine, cette révélation indique que la souche sélectionnée est capable de produire l'enzyme amylase. (Gunam *et al.*, 2021). L'indice amylolytique est calculé selon la formule : $IA = \frac{\text{diamètre de zone claire}}{\text{diamètre de zone de colonie}}$.

5.3.4. Activité pectinolytique

Pour l'activité pectinolytique, les souches antagonistes ont été cultivées sur un milieu gélosé à base de pectine. Le milieu a été transféré dans des boîtes de Pétri et inoculé avec un disque de gélose pour les moisissures et une ligne pour les actinomycètes et incubé à 30°C pendant 3 à 5 jours (Cherkupally *et al.*, 2017). Après l'incubation, les colonies présentant des zones claires lors de l'inondation avec une solution d'iode ont été sélectionnées comme productrices de pectinase (Roy *et al.*, 2018). L'indice enzymatique relatif (diamètre de la zone/diamètre de la colonie) a été calculé.

5.3.5. Activité lipolytique et estérolytique

Pour cribler la production de lipase, un milieu de culture à base de gélose additionné de 1% de Tween 20 ou Tween 80 est préparé. Le Tween 80 est utilisé pour la détection des lipases car il contient des esters d'acide oléique, tandis que le Tween 20 est utilisé pour les estérases car il contient des esters d'acides gras à courte chaîne (Ramnath *et al.*, 2017). Les souches sontensemencées sur les boîtes de Pétri et incubé à 30°C pendant 3 à 5 jours. L'activité lipolytique a été déterminée par la formation d'une zone de précipité autour de la colonie (Kanimozhi et Perinbam, 2015). L'indice enzymatique relatif (diamètre de la zone/diamètre de la colonie) a été calculé

5.3.6. Activité chitinolytique

Le milieu de détection de l'enzyme chitinase consistait en un milieu à base de la chitine (Annexe 1). Des cultures âgées des isolats sélectionnés ont été inoculés dans le milieu et incubées à 30°C, puis observés pour la formation de zones colorées (Ghorri, 2015).

5.3.7. Activité laccase

Le criblage de l'activité laccase a été effectué en inoculant les souches sélectionnées âgées de 5 jours de culture sur des boîtes contenant un milieu gélosé additionné de 0.4% de 2-6 diméthoxyphénol (DMP). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 7 jours avec une observation quotidienne. Une coloration brune intense autour des colonies ou le changement de milieu de culture vers le jaune ou marron clair est considéré comme un indice de la production de laccase (Dullah *et al.*, 2021).

6. Criblage de l'activité antifongique des molécules bioactives secrétées par les antagonistes fongiques et actinomycétales

L'inhibition de la croissance mycélienne d'*Alternaria* a été testée par la culture de filtrat qui contient les métabolites sécrétés par l'antagoniste dans un milieu de culture liquide selon le protocole décrit par Hao *et al.*, (2020).

Un volume de 50 mL de bouillon dextrose de pomme de terre (PDB) stérilisé utilisé pour la fermentation des antagonistes fongiques et 50 mL de bouillon ISP2 stérilisé et utilisé pour la fermentation des antagonistes actinomycétales ont été répartis dans des flacons Erlenmeyer de 250 mL, chaque récipient est inoculé avec des disques de 5 mm de diamètre provenant du bord des cultures des antagoniste vieilles de 5 à 7 jours. Chaque flacon a été inoculé en trois exemplaires et l'ensemble a été incubés 15 jours à 30°C dans des conditions statiques. Après 15 jours, les bouillons des cultures ont été filtrés à travers le papier filtre Whatman No.1 et stérilisés par filtration sur membrane millipore de 0,22 mm et conservé à 4°C pour une utilisation ultérieure (Li *et al.*, 2015).

Les filtrats de culture des antagonistes ont été dilués et mélangés aux milieux gélosés PDA et ISP2 de manière à avoir un traitement de différentes concentration (10%, 20 % et 40%). Les milieux additionnés de filtrat sont ensuite versés dans des boîtes de Pétri. Après solidification, les boîtes de Pétri ont été soigneusement inoculées avec des disques de 5 mm de l'agent pathogène *Alternaria* sp., prélevé à partir d'une culture de quatre jours (Rahman *et al.*, 2020 ; Tlemsani *et al.*, 2020).

Les boîtes ont ensuite été incubées à 30°C. Trois répétitions ont été maintenues pour chaque traitement. Des observations périodiques sur la croissance radiale du mycélium ont été enregistrées après 4 à 5 jours d'inoculation. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène testé a été calculé par la formule suivante :

$$I=(C-T) / C \times 100$$

Où I est le pourcentage d'inhibition de la croissance du pathogène *Alternaria*, C est la croissance radiale du pathogène (mm) pour le contrôle, T est la croissance radiale de l'agent pathogène (mm) dans le traitement (**Rahman et al., 2020 ; Tlemsani et al., 2020**).

7. Analyse statistique

Une analyse de variance (ANOVA) des données a été réalisée à l'aide du logiciel statistique IBM SPSS (IBM SPSS Statistics version 26.0). Les tests d'honnêteté de Tukey (Tukey's HSD) ont été effectués pour déterminer les différences significatives entre les souches antagonistes en analysant la présence ou l'absence de différences entre les concentrations de filtrat (10 %, 20 % et 40 %). La différence était significative avec une valeur de p inférieure à 0,05 ($P < 0,05$).

Partie 2. Criblage in planta de l'activité antifongique des souches antagonistes contre le phytopathogène *Alternaria* sp.

Dans cet essai, des tomates mûres et saines sont utilisées. Les surfaces des tomates ont été stérilisées avec une solution d'hypochlorite de sodium (NaClO) à 1 % (p/v) pendant 2 min, puis lavées à l'eau et naturellement séchées.

Une plaie uniforme (4 mm de profondeur × 4 mm de diamètre) a été créée à l'équateur du fruit de tomate à l'aide d'un bistouri stérile. Ensuite, 200 µL de filtrat des souches les plus actives (présentant des résultats importants dans les tests précédents) ont été pipetés dans chaque plaie. Après séchage à l'air pendant 2 heures, 15 µL de solution sporale des souches phytopathogènes d'*Alternaria* (100 conidies/ml) a été insérée dans chaque plaie. Par la suite, les fruits ont été placés sur du papier absorbant humide dans des pots en plastique pour conserver un haut niveau d'humidité, et ceux-ci ont été incubés à 20°C. un volume de 15 µL de solution sporale des souches phytopathogène est inoculé seules dans la plaie utilisée comme un control. Aussi un volume de 200 µL de filtrat des antagonistes est inoculé seul pour confirmer que le filtrat utilisé ne contient pas de spores fongiques. L'expérience a été réalisée en triple. Après incubation pendant 4 à 6 jours, le diamètre de la lésion a été mesurés. L'efficacité de biocontrôle (%) a été calculée à l'aide de la formule :

$(A1 - A2) / A1 \times 100$, où A1 et A2 représentent les zones altérées dans le groupe de traitement et le groupe témoin, respectivement (**Sarven et al., 2020 ; Li et al., 2021**).

Partie 3 : Criblage in silico de l'activité antifongique

Dans cette partie d'étude, un criblage in silico de l'activité antifongique des métabolites fongiques et actinomycétales a été réalisé sur la base de la recherche bibliographique. Dans ce contexte, plusieurs cibles enzymatiques impliquées dans la virulence de l'espèce phytopathogène *Alternaria* sp. ont été choisies. L'identification des métabolites secondaires fongiques et actinomycétales qui ont un potentiel inhibiteur contre les cibles enzymatiques sélectionnées a été basé sur un ensemble d'approches computationnelles incluant la modélisation moléculaire, le docking moléculaire, la simulation moléculaire dynamique, ainsi que l'analyse des propriétés pharmacocinétiques.

1. Prédiction des structures 3D des enzymes cibles par la modélisation homologue

Dans cette partie, nous avons réalisé une prédiction des structures trois dimensionnelles d'un ensemble de neuf enzymes impliquées dans le processus de virulence de l'espèce *Alternaria* sp. Ces enzymes ont été choisies comme cibles potentielles pour les métabolites secondaires d'origine fongique et actinomycétale. Comme les structures cristallisées de ces enzymes ne sont pas disponibles au niveau de la base de données des protéines PDB, il est donc crucial de prédire leurs structures computationnellement, pour cela la méthode de la modélisation homologue a été adoptée. Les enzymes choisies comme cibles potentielles des molécules microbiennes biofongicides sont :

- 4HNR (1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene réductase)
- 3HNR (1,3,8-trihydroxynaphthalene réductase)
- Cystathionine bêta lyase
- Homoserine O-acétyltransférase
- Glutathione réductase
- Pecate lyase
- Scytalone déhydratase
- Thioredoxin peroxidase
- Thioredoxin réductase

1.1. Préparation des séquences cibles

Les séquences protéiques des 9 enzymes cibles ont tout d'abord été téléchargées partir de la base de données NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), en spécifiant le nom de l'enzyme

et du genre *Alternaria* comme mots clés pour notre recherche, et en ciblant la base de données « Protein ».

Les séquences sont ensuite récupérées sous format Fasta :

```
>QIH29421.1 cystathionine beta-lyase [Alternaria alternata]
MAGESSKANAAGKAAIPLDIDGHNLPSPAPSSPRNGRKYALMTELVYTESTDQYNASSVPYQSATFKQESATG
GGGEYDYTRSGNPNTRTHLERHLAKIMNANRALVVSSGMGALDVIITRLLRPGDEVVTGDDLYGGTNRLKYLSTHG
GIIIVHHVDTTNPEKRVREVVNNTAMVLETPTNPLIKICDIPAIASIAHAANPTAVVAVDNTMMSPLLNLPLDLG
SDIVYESGTKYLSGHHDLMAGVIAINDSALGDRLFFITINASGCGLSPFDSWLLLLRGIKTLGVRMEKQQANAMRVA
TFLESHGFKVRYPGKLSHPQYDLHWSMARGAGAVLSFETGDVITISERIVESARLWGISVSVFGCVNSLISMPCRMS
HASIDEKTRKERNMPEDIIRLCVGIEDPEDLLDDLSRALVQAGAVNITTEGFQALAAEAPASSQPTEAVPAPAES
```

```
>OWY41743.1 homoserine O-acetyltransferase [Alternaria alternata]
MDSQGLGAETANGSKKYRTVSSQPENPFANLIPDQTFAVIPQVTLESGVVLQNVSVAYKTYGTLAPSGDNAMVIC
HALTGSADVDGWWGPLLGGPGKAFDISRFFVVCMNLSGSPYGSASPVTAKDGDASLGPYGPFFLTTVRDDVNVF
KLILDDLGVKQIAAVIGGSMGMLVLEFAYFGKDYVRTIIPAIATSARYSAWGISWGEAQRQSIYSDPKYDDGYYS
YEDPPSTGLGAARMSALLTYRSRDSFESRFGRNTPDLSKKQSINTVPRPTTPSNPSHEHWAIHNNHGHNAGSPRL
MSRSNSSTAI PGSAAAQADLEFHDASGPGTPNLQRTSSTSSNGAFPRSSKPLAPHYFSAQSYLRYQADKFIKRFD
ANCYIAITRKLDTHDVSRYRYPEGETPDTLDPVSALHHALSLIEQPTLVLGIQSDGLFTFAEQKELAACIPKATL
KTIDSPDGHDAFLLEFEQVNKHLGLFNTELPEIMNRTPNVETVKSDTGMTATKTSTFGAEVEDITAW
```

```
>OWY52444.1 glutathione reductase [Alternaria alternata]
MSSQTKECDYLVIGIGSGGIASGRRAAKHGAKVIAIESSRYGGTCVNVGCVPKKVTWNAAAIAETFKDAKAYGFK
VGGVPDFDWPYFKKKRDDYVYKRLNGIYENNLNKDEIEHLRGRAKFAKDEVEVALHDGGSQRIKAKHILIAATGGR
PKLPDIPGKELCISDGFDFLEKQPKSIATSGAGYIGVEMTGMLHALGSKTHFFIRGDKLLRTFDPMIQDVTVQEQE
YERQGINLYKGTQITKVEDIGNMKRVTYQNNETKNESTVEVEEVLFATGRDPEIEDLKIKDFGIKLNKHNHIVT
DEYQNTSIPNIYAIGDVCDRGFELTPVAIAAGRRLSDRLFNNQPKAHLEYENIPSVVFAHPEIGSIGLTEPEARE
KYGDKIKIYKTEFKAMYFAMMDPEEKQPTAYKIIICAGENEKVVGLHILGQGSSEILQGFVVAIKMGATKKDFDSC
VAIHPVSAEELVTMT
```

```
>AKC92823.1 pecate lyase PL4813 [Alternaria brassicicola]
MQFTPLTLAALIASLASGQTLNIPARVGNVQLATNTRITANRDFGMAEFDGTCNQEANGDPVFIELEDGVTISN
LIIGPNQIDGICRGRCTLRNVWFRNVCEDAVTALGPGDVLIIEGGGATGANDKVIQHNGRGRVTIRNYTVTNSGK
LYRSCGNCNSNNQANSRVSVVENVRASGMTSDLVAMNPNFGDTATITRSCGNSNRVVCQPYTGVERGQGDGPKMD
NKDGCLGAQGLLNRLPAC
```

```
>OWY43674.1 scytalone dehydratase [Alternaria alternata]
MFEKNELKPTFEDVMGCQSACYEWADSYDSKDWDRLRKCIAPTLRIDYRSFLDKIWEAMPADEFVAMASDPAVLG
NPLLKTQHFIGGTRWEKTSEDEIIGYHQLRVPHQRYTDETRTKVAVKGAHSAFNMHWYKKIDGEWKFAGLNPDIR
WFEYDFDKVFAEGREQLGEAKAAAGIPEKLTGQAL
```

```

>AWO14275.1 thioredoxin peroxidase 1 [Alternaria alternata]
MAFPAYTPKARVQKPAPHFSGTAVVDGTFEDLSLTAYTSTKQWLVLGFVPMAWTFVCPTEIIAFSERASDFAARG
ASVVFSSSTDSEYSLLAWTNASKKDGGLGKINIPLLSDKNHSIAKDYGVLIIEEGIALRGLFLIDPENGIVRQITIN
DLPVGRSVDETLRLIDAFQFTDKYGEVCPANWNPGETIKATPAGNKEYLDKLNHADTKMSDVATKTNGTTSSAH

>OWY50165.1 thioredoxin reductase [Alternaria alternata]
MHSKLVIIIGSGPAGHTAAIYAARADLNPMYEGFMALGIAAGGQLTTTDEVENFPGFTKIGGGKLMEQMREQSEA
CGTEIISQTVAKVDLKPAPFKYWLHPMGDEEEIEEEEHTADALI IATGAKARRLDLKGEDKYWNGVVSACAVCDG
SLPMFREQLVVIIGGGDSAVEEALYLTKKASKVTVLVRRDQLRASRTNARRLTTHPKIEIILYNTSASEIKGEEKK
NGLMTQLVVKNNVTKEEQTLEAKGLFYAVGHDPATELFKGLDMDDEDGYLITKPGEGLTSTVEGVFAAGDVQDKRY
RQAITSAAGSGCIAALEAEKWLAEQDDSVGNELETENQAEKSQTNGVVPEYRSNPLL

>AXB87952.1 1,3,8-trihydroxynaphthalene reductase, partial [Alternaria
alternata]
LAGKVAVVTGSGRGIGKAMAIELAKRGAKVAVNYANAVEGAEQVVKEIKALGNGSDAAAFKANVGNVEESEKLM
DVVAHFGLDICCNSGVVSGFHFKDVTPEEFDRVFTINTRGQFFVAKAAYKRMEMGGRIILMGSITGQAKGVPK
HAVYSGSKGAIETFTRCMAI

>KAG9185037.1 tetrahydroxynaphthalene reductase [Alternaria panax]
MSVVPSSSLEGGKAVVTGSSRGIGAAIALELAQRGAKVAVNYLNSVSDAEQVVERIKDLGNGSDAALFQANVDNI
EETGKLMNDNVVAHFGRDLICCNSAGIHSSGHFSDVTAEDFDRFTTTNTRAQFFVAQEAYKRMEVGGRIIFTSSIT
AQAKSIPKHAVYAGSKGAIESIARCMAVDAGDKKVTVNCVAPGGVRTDMFYAGRDKVVPDDEKDNVDAYISRSLP
HHRIGETS DVS RVVAFLASQDGEWVNGKVIGIDGGANM

```

1.2. Identification et sélection des séquences protéiques templates

Les structures 3D des protéines cibles ne sont pas disponibles dans la base de données Protein Data Bank (PDB). Dans l'objectif de trouver des structures templates adéquats pour la modélisation homologue de chaque protéine cible, une recherche a été effectuée au moyen de l'algorithme BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) contre la base de données PDB. Dans la sélection des protéines template un ensemble de critères a été pris en considération, à savoir un pourcentage d'identité élevé, une faible E-value, et une bonne couverture de la requête. Les meilleurs résultats ont été utilisés comme templates, où ils sont chargés et enregistrés sous format PDB pour être utilisés comme séquences templates.

1.3. Modélisation des protéines cibles

Pour la génération des structures 3D modèles des 9 cibles enzymatiques de *Alternaria* sp., les séquences protéiques templates répondant aux critères de sélection précédemment cités ont été utilisées comme séquences d'interrogation pour le logiciel Modeller 10.1 (John et Sali, 2003). Les modèles ont été choisis sur la base du score DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) (Shen et Sali, 2006).

1.4. Evaluation des modèles

Les modèles prédits ont été minimisés en énergie à l'aide de ModRefiner (Xu et Zhang, 2011). Pymol a été utilisé pour aligner les structures 3D des modèles prédits et des meilleurs templates, et l'écart quadratique moyen (RMSD) a été calculé par le même programme. La qualité stéréochimique des modèles prédits a été évaluée à l'aide des programmes PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993), VERIFY3D (Eisenberg *et al.*, 1997) et ERRAT (Colovos et Yeates, 1993) du serveur Web SAVES (<https://saves.mbi.ucla.edu/>). Le programme PROSA (Wiederstein et Sippl, 2007) et QMEAN.40 du SwissModel (Benkert *et al.*, 2011) ont été utilisés pour calculer le Z-score et le QMEAN des modèles.

2. Prédiction des sites actives des protéines modèles

Après la construction et la validation des modèles finaux, le serveur CASTp (Atlas informatisé de la topographie de surface de protéines) (<http://sts.bioe.uic.edu/castp>) (Binkowski *et al.*, 2003) a été utilisé pour la localisation géométrique des sites actifs des protéines prédites. D'un autre côté, les résidus catalytiques potentiels des sites actifs des récepteurs prédits ont été recherchés sur la base de la comparaison structurale des modèles et des templates en procédant à un alignement des séquences cibles et de leurs structures prédites avec les séquences et les structures cristallisées de leurs templates respectifs par le programme Pymol. Ces alignements permettent d'identifier les résidus clés correspondants dans les protéines modélisées.

3. Etudes des interactions par Docking moléculaire

3.1. Préparation des récepteurs cibles

Les structures 3D des modèles cibles ont été préparées pour le docking moléculaire par une étape d'optimisation préalable à l'aide du package UCSF Chimera 1.13. Les atomes d'hydrogènes ont été rajoutés et l'énergie globale des structures protéiques a été minimisée

par le champ de force AMBER ff14SB. Les structures 3D des protéines ont ensuite été enregistrées sous format mol2 prêts pour l'amarrage.

3.2. Préparation des ligands

113 métabolites secondaires d'origine actinomycète et 100 d'origine fongique ont été obtenus à partir de diverses sources de la littérature (**Annexe 2**). Les SMILES canoniques de ces molécules ont été extraites de la base de données PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). En plus de ces molécules, les fongicides chimiques conventionnels connus pour avoir des effets inhibiteurs sur les activités des enzymes cibles, ainsi que les ligands co-cristallisés avec la meilleurs templates ont été pris comme molécules de référence. Après la construction des structures 3D de tous les ligands par l'outil UCSF Chimera, l'attribution des charges Gasteiger, suivie de la protonation et de la minimisation de l'énergie a été effectuée pour chaque ligand. Finalement, les molécules ont été sauvegardées sous format mol2.

3.3. Docking moléculaire

La procédure d'amarrage moléculaire a été réalisée par le programme Autodock Vina connu pour sa précision et sa rapidité (**Trott et Olson, 2010**). Pour la validation du processus d'amarrage, les structures des ligands co-cristallisés avec les templates (si présents) ont été extraites de la base de données PubChem et utilisée dans une étape d'amarrage préliminaire au niveau du site géométrique du modèle correspondant à la localisation du site actif (où se trouve le ligand co-cristallisé) et cela après la superposition des deux structures modèle et template. Les dimensions de la boîte de grille générées pour chaque enzyme sont résumées dans le **tableau 5**. La valeur RMSD (Root-Mean-Square Deviation) entre les deux ligands co-cristallisé et amarré est alors calculée pour estimer le degré de précision du processus de docking moléculaire utilisé dans cette étude. L'énergie de liaison obtenue à partir des ligands co-cristallisés a été prise comme référence, où seuls les composés avec des scores inférieurs à cette référence ont été considérés comme des inhibiteurs potentiels contre l'activité biologique des enzymes cibles.

Tableau 5. Dimensions de la boîte de grille du site actif des enzymes cibles modélisées.

Enzyme cible	Centre (Å)	Taille (Å)
Cystathionine β -lyase	X=31,8, Y=78, Z=21,7	X'=15,3, Y'=15,2, Z'=21,7
Glutathione reductase	X=9,6, Y=27, Z=-13,5	X'=13,5, Y'=19, Z'=15,6
Pecate lyase	X=8,7, Y=1,6, Z=34,9	X'=16, Y'=12,6, Z'=11,9
Homoserine O-acétyltransférase	X=101,5, Y=3,40, Z=40,2	X'=15,9, Y'=12,4, Z'=16,9
Scytalone déshydratase	X=29,2, Y=36,7, Z=22,7	X'=10, Y'=11,5, Z'=10
Thioredoxin peroxydase	X=67,8, Y=15,5, Z=13	X'=11,9, Y'=13,5, Z'=11,1
thioredoxin réductase	X=-70,2, Y=18,1, Z=-45,1	X'=20,8, Y'=20, Z'=18,8
3HNR (1,3,8-trihydroxynaphthalene reductase)	X=85,3, Y=15,3, Z=16,3	X'=14,1, Y'=12,6, Z'=7,8
4HNR (1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene reductase)	X=84,16, Y=16,6, Z=12,4	X'=17,8, Y'=18,5, Z'=20,3

Avant d'amarrer les ligands choisis, il faut valider le processus de docking moléculaire avec une molécule de référence si trouvée qui a été chois sur la base de la littérature (**Tableau6**).

Tableau 6. Les ligands de références utilisés pour les enzymes cibles modélisées

Enzyme cible	Molécule de référence	Références bibliographiques
Cystathionine β -lyase	Pyrimethanil, Cyprodinil, mepanipyrim	(Waechter <i>et al.</i> , 2010)
Glutathione reductase	Carbendazim	(Singh et Kaur, 1996)
Pecate lyase	-	-
Homoserine O-acétyltransférase	Cyprodinil	(Kuplińska et Rząd, 2021)
Scytalone déshydratase	Carpropamid	(Nakasako <i>et al.</i> , 1998)
Thioredoxin peroxydase	-	-
Thioredoxin réductase	-	-
3HNR (1,3,8-trihydroxynaphthalene reductase)	Pyroquillon, Tricyclazole, 4-nitro - inden-1- one, Phthalide	(Liao <i>et al.</i> , 2001 ; Brunskole <i>et al.</i> , 2011)
4HNR (1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene reductase)	Pyroquillon, Tricyclazole	(Thompson <i>et al.</i> , 2000)

3.4. Visualisation des interactions moléculaires

Les interactions moléculaires entre les complexes protéine-ligand, comprenant les liaisons hydrogène, liaisons hydrophobiques, liaisons électrostatiques et liaisons Van Der Waals ont été analysés et visualisés à l'aide du programme Discovery Studio 4.0 (**Biovia, 2017**).

4. Etude des propriétés ADMET et ressemblance médicamenteuse (Drug Likeness)

L'analyse de l'activité de ressemblance médicamenteuse a été réalisée pour étudier les propriétés médicamenteuses des molécules sélectionnées, pour cette raison, le programme open source SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>) a été utilisé pour évaluer l'importance pharmacologique des molécules sélectionnées sur la base de différentes règles de ressemblance médicamenteuse, à savoir la règle de Lipinski, la règle de Veber, et le filtre de Ghose. L'étude pharmacocinétique a également été établie pour caractériser l'absorption, la distribution, le métabolisme, l'excrétion et la toxicité (ADMET) des ligands sélectionnés. Cette étude comprenait différents facteurs, à savoir la pénétration de la barrière hémato-encéphalique (BBB), liaison aux protéines plasmatiques (PPB), absorption intestinale humaine (HIA), transport de la glycoprotéine P (Pgp), perméabilité des cellules Caco-2. Le métabolisme est prédit sur la base des modèles cytochromiques CYP pour le substrat ou l'inhibiteur (CYP2D6, CYP3A4, CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 et CYP3A4). L'excrétion est prédite sur la base du modèle de clairance totale (Cl). La toxicité des médicaments est prédite sur la base de la toxicité AMES (test de mutagénicité), inhibition hERG (de l'anglais : human Ether-à-go-go-Related Gene), hépatotoxicité, dangers respiratoires, corrosion oculaire, perturbateurs endocriniens et sensibilisation cutanée. Ces paramètres ont été calculés et vérifiés pour la conformité avec leur plage standard (**Han et al., 2019**). Les propriétés ADMET des ligands ont été analysées à l'aide des serveurs ADMETSar (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetsar2/>) et ADMETLab (<https://admetmesh.cbdd.com/>).

5. Simulation de la dynamique moléculaire

Dans cette analyse, seuls les métabolites secondaires d'origine actinomycétale actifs contre la cible enzymatique 3HNR ont fait l'objet d'une simulation de leur dynamique moléculaire (SDM). La SDM a été réalisée pour les complexes protéine-ligand donnant les meilleurs résultats dans le docking moléculaire et l'analyse ADMET selon le diagramme suivant (**Figure 20**) :

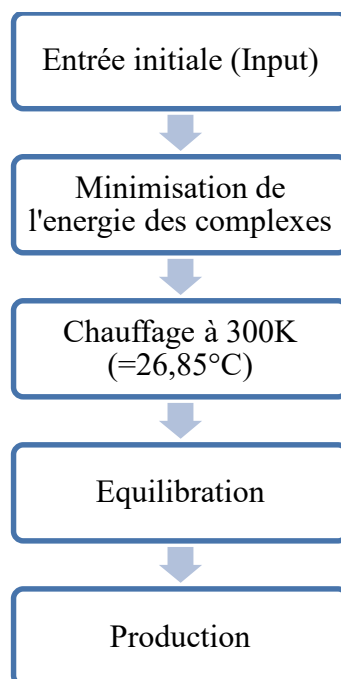


Figure 20. Stratégie de la simulation de la dynamique moléculaire

5.1.Initialisation : fichiers structure/topologie/champ de force

Trois fichiers d'entrée sont nécessaires pour lancer les simulations. Il s'agit du fichier de topologie input.psf, du fichier de coordonnées input.pdb et du fichier de champ de force par_all22_prot.inp (partie du champ de force CHARMM36). Le fichier de topologie contient toutes les informations sur la structure et la connectivité des atomes dans le système récepteur-ligand ainsi que quelques paramètres du champ de force.

5.2.Minimisation de l'énergie

La première « vraie » étape dans la préparation du système pour les SDM implique la minimisation de l'énergie. Le but de cette étape n'est pas de trouver un véritable minimum d'énergie globale, mais d'ajuster la structure au champ de force, à la distribution particulière des molécules de solvant, et de relâcher les éventuels conflits stériques créés en devinant les coordonnées des atomes lors de la génération du fichier psf.

5.3. Chauffage du système de la simulation

Au cours de cette étape, la température du système est augmentée linéairement de 0K à 300K. À chaque étape d'intégration, les vitesses sont réaffectées à partir d'une nouvelle distribution de Maxwell et la température est incrémentée de 0,001 K. ce qui influence

l'énergie potentielle (E_p) du système récepteur-ligand. Notez que la température instantanée $T(t)$ et l'énergie E_p fluctuent en raison de la taille du système.

5.4. Équilibrage à température constante

L'étape d'équilibrage est utilisée pour équilibrer les énergies cinétiques et potentielles, c'est-à-dire pour répartir l'énergie cinétique dans le système pendant le chauffage. Cela implique généralement que l'énergie potentielle "reste en retard" et doit être équilibrée avec l'énergie cinétique. En d'autres termes, l'énergie cinétique doit être transférée à l'énergie potentielle.

5.5. Phase de production de la trajectoire MD

Cette étape de la trajectoire MD est utilisée pour échantillonner les caractéristiques structurales et la dynamique du système étudié à 300K.

Dans notre cas, le logiciel NAMD 2.14 a été utilisé pour suivre la dynamique moléculaire de nos systèmes récepteurs-ligands d'intérêt. Les fichiers de topologie des ligands et des protéines ont été générés à l'aide du serveur CharmmGUI (Jo *et al.*, 2008). Le champ de force CHARMM36 (Vanommeslaeghe *et al.*, 2009) a été appliqué. Tout d'abord, une boîte de solvation de l'eau a été construite en utilisant le modèle de l'eau TIP3P, puis le système solvaté a été neutralisé par addition d'ions Na^+/Cl^- . Une minimisation d'énergie a été réalisée, suivie d'une étape d'équilibrage à un pas de temps de 2 fs pendant 10 ns en utilisant un volume et température constants (NVT) à 300 K. La production a finalement été exécutée pendant 50 ns (25 000 000 pas) avec un pas de temps de 2fs. La stabilité des complexes protéine-ligand a été étudiée en analysant les trajectoires de l'écart quadratique moyen (RMSD), de la fluctuation quadratique moyenne (RMSF), du rayon de giration (R_g), des liaisons hydrogène et de la surface accessible au solvant (SASA) avec l'outil de la visualisation VMD en chargeant le fichier topologique .psf et la trajectoire de la simulation .dcd

Résultats et discussion

« Le but de la discussion ne doit pas être la victoire, mais l'amélioration »

De *Joseph Joubert*

Les brûlures alteriennes, en particulier la tache brune et noire causées par le genre phytopathogène « *Alternaria* », provoquent des dommages importants aux plantes dans le monde entier. Elles donnent des symptômes non seulement sur les fruits mais aussi sur les feuilles et les rameaux (Achetbi *et al.*, 2021). La tomate est parmi les principales plantes touchées par ce fléaux phytopathogène et dont le poids économique et industriel est bien pesant en Algérie.

Maintenant, le contrôle d'*Alternaria* dépend principalement des fongicides chimiques. Cependant, la résistance aux fongicides et les effets environnementaux néfastes augmentent les préoccupations et sont devenus des facteurs limitants dans l'utilisation des fongicides dans la production de tomates. Par conséquent, la lutte biologique a reçu une attention croissante dans le développement de l'agriculture durable en raison de ses avantages, notamment une efficacité significative, une biodégradabilité et un effet durable sur les maladies post-récolte (Carrascal-Hernández *et al.*, 2022).

Un agent de lutte biologique doit essentiellement exercer des niveaux suffisants d'activité antagoniste contre une grande variété de pathogènes. Il existe de nombreux cas où l'objectif d'un contrôle durable des maladies contre les pathogènes fongiques est obtenue par un large éventail de microorganismes (Jung *et al.*, 2018). Le biocontrôle des maladies par antagonisme directe contre des agents pathogènes repose principalement sur ces mécanismes : le parasitisme, l'excrétion de composés antimicrobiens, y compris les enzymes dégradant la paroi cellulaire, tels que les chitinases, protéases et glucanases ou de métabolites antimicrobiens volatils ou non volatils. Autre mécanisme implique la sécrétion d'enzymes qui interfèrent avec des facteurs de pathogénicité, tels que les pectinases et les cellulases, réduisant ainsi la virulence des pathogènes. Enfin, la compétition pour les nutriments ou l'espace sur la plante, conduisant à une pression d'infection réduite de l'agent pathogène (Raymaekers *et al.*, 2020).

Partie 1. Criblage *in vitro* de l'activité antifongique contre le phytopathogène *Alternaria* sp.

Dans cette partie de notre étude, nous avons procédé à un criblage de l'activité antagoniste des agents de la lutte biologique contre le pathogène cible *Alternaria* sp. ce qui est considéré comme une étape critique dans la démarche du procédé du biocontrôle. Les isolats sont sélectionnés par un criblage primaire de confrontation directe *in vitro*, ils sont ensuite

soumis à des essais biologiques d'efficacité dans des environnements contrôlés à petite échelle sur l'agent pathogène afin d'établir la capacité de performance de l'agent biologique sur le terrain. Une corrélation entre les tests de biocontrôle *in vitro* et les tests de performances *in planta* détermine l'efficacité du biocontrôle.

1. Isolement des microorganismes antagonistes

Dans notre étude nous nous sommes focalisés sur deux taxa microbiens, à savoir les actinomycètes et les champignons. Notre choix n'est pas arbitraire, mais basé sur la grande capacité de ces deux microorganismes à s'engager dans des interactions bénéfiques avec les plantes, stimulant la croissance des plantes et la résistance aux maladies. Les membres de ces deux taxa microbiens sont particulièrement intéressants en raison de leur potentiel métabolique polyvalent et leur capacité à inhiber la croissance d'un large éventail de phytopathogènes. En plus, ils constituent des colonisateurs fréquents des rhizosphères et des tissus végétaux (Thambugala *et al.*, 2020 ; Ebrahimi-Zarandi *et al.*, 2022).

Les champignons et les actinobactéries sont les microbes les plus dominants du sol. Ils sont importants pour le cycle du carbone, de l'azote, du phosphore, du potassium et de plusieurs autres éléments du sol. En tant que saprophytes, ils produisent une gamme d'enzymes hydrolytiques extracellulaires qui peuvent dégrader les polymères animaux et végétaux, notamment la lignine, la cellulose, la chitine et d'autres composés organiques. Ces microorganismes jouent un rôle central dans les interactions biotiques et abiotiques dans le sol, participant à la décomposition de la matière organique et au recyclage des nutriments pour les rendre disponibles aux plantes, et ils sont également impliqués dans la fertilité du sol (Zhang *et al.*, 2019 ; Rosas-Medina *et al.*, 2020).

L'isolement des microorganismes (champignons et actinomycètes) a été effectué à partir de 3 régions de sols agricoles (Ain Beida, Oum El Bouaghi et Ain Fakroun). Pendant une période de 15 à 21 jours d'incubation à 30°C, les microorganismes étudiés apparaissent lentement. Ils ont été repérés d'après leurs aspects macroscopiques et microscopiques caractéristiques et purifiés afin d'obtenir des cultures pures. Un total de 68 souches de champignons et 30 souches d'actinomycètes ont été isolées. Les résultats d'isolement sont représentés dans la **figure 21**.

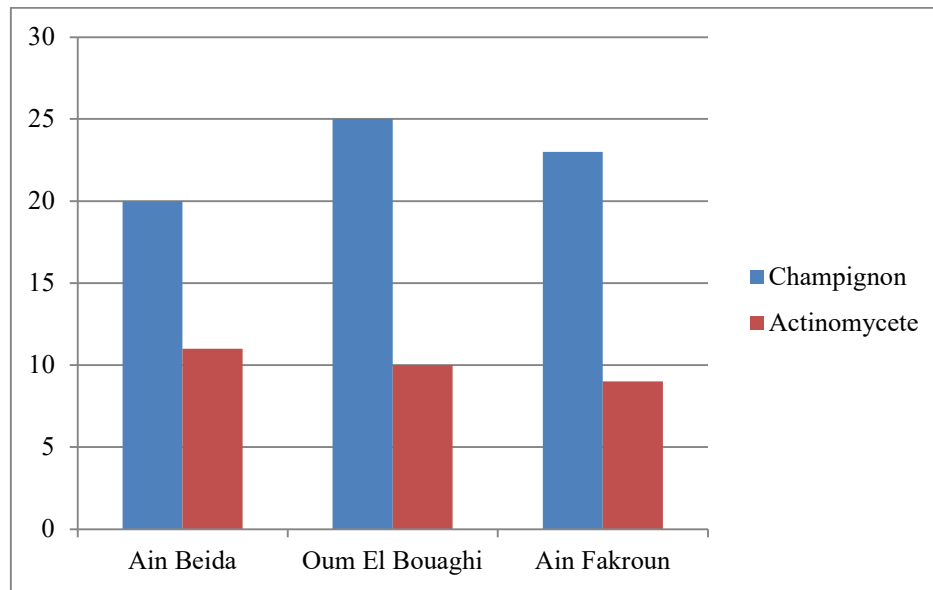


Figure 21. Histogramme représentant le nombre d'isolats de champignons et d'actinomycètes selon le type de sol.

Les résultats montrent que les isolats de champignons sont plus abondants par rapport aux actinomycètes dans les trois types de sols. Un résultat similaire est rapporté par **Panaiyadiyan et Chellaia (2011)** qui montrent que les sols agricoles sont des réservoirs très riches en moisissures. D'un autre côté, une fluctuation du nombre des deux groupes microbiens est observée entre les 3 sols agricoles. En effet, les interactions entre les espèces végétales, le sol et les communautés microbiennes ont été rapportées dans la littérature (**Marschner et al., 2001**). Le type de sol a été considéré comme un facteur déterminant dans la composition des populations microbiennes dans les sols cultivables (**Damastri et al., 1999 ; Girvan et al., 2003**). Cependant, d'autres auteurs (**Pinto et Nahas, 2002 ; Sanomiya et Nahas, 2003**) ont montré que dans un même type de sol différentes espèces végétales influencent la répartition des populations microbiennes.

D'un autre côté, les engrais chimiques ou le fumier augmentaient le nombre d'actinomycètes et de champignons totaux et sporulés dans le sol (**Kanazawa et al., 1988**). **Belay et al. (2002)** ont également rapporté un effet direct du NPK sur le nombre d'actinomycètes et de champignons dans un sol cultivé en maïs. Par conséquent, les résultats de cette étude suggèrent que la variation de la population microbienne dans les sols étudiés pourrait être attribuée à l'effet du type de sol, type de la végétation et la fertilisation chimique utilisée.

2. Isolement des champignons phytopathogènes

L'isolement de l'agent phytopathogène « *Alternaria* » a été réalisée à partir de différents frites de tomates infectées en provenance d'Ain Beida, Oum El Bouaghi et Constantine.

En se basant sur les caractéristiques macro-microscopiques principales d'*Alternaria*, trois isolats ont été sélectionnés, purifiés et notés par les abréviations Tom1, Tom2 et Tom3. Les isolats obtenus ont été identifiés selon les méthodes d'identifications morphologiques (macroscopiques et microscopiques). Après sept jours d'incubation, des colonies filamenteuses foncées ont été récupérées. Ces colonies avaient initialement des surfaces à un aspect duveteux laineux de couleur blanc grisâtre, et elles sont ensuite devenues noir verdâtre avec une bordure plus claire régulier (pour Tom 2 et Tom 3) et irrégulier (Tome 1). Dans certaines régions, les colonies étaient recouvertes d'hyphes aériens courts et grisâtres (Tom 3). Le revers était brun foncé ou presque noir (Figures 22, 23, et 24).

Les frottis colorés au bleu de coton au lactophénol ont montré des hyphes cloisonnés et foncés, ainsi que des conidiophores et une morphologie conidienne typique du genre *Alternaria* (Figures 22, 23, et 24). Les conidiophores étaient pour la plupart non ramifiés, cloisonnés et de longueur variable. Les conidies étaient grandes, transversales et longitudinales ou cloisonnées obliquement et étaient formées individuellement, avec des cicatrices simples à leurs extrémités ou en chaînes non ramifiées de dix ou plus (Figures 22, 23, et 24). Les résultats sont en accord avec **Pusz, (2009)** qui trouve que les colonies d'*Alternaria* isolé d'*Amaranthus* variaient du gris clair au gris foncé. De la même manière, **Rai et Kumari, (2009)** ont observé des colonies cotonneuses, compacts de couleur gris clair à gris foncé chez *Alternaria* infectant la pervenche. Les découvertes de **Hubballi et al., (2011)** et **Sofi et al., (2013)** ont montré une variation de la pigmentation de ce genre produisant des isolats noirs, noir brunâtre, noir verdâtre, brun et jaune. En effet, le principal caractère morphologique pour identifier ce genre est la forme de conidie qui s'apparaît sous forme ovale ou ellipsoïdal (**Garganese et al., 2016**). *Alternaria* se caractérise comme un hyphomycète dématié dont les conidies colorées à septa transversaux et longitudinaux, se développent sur un site très restreint du sommet des conidiophores distinctifs (**Woudenberg, 2015**).

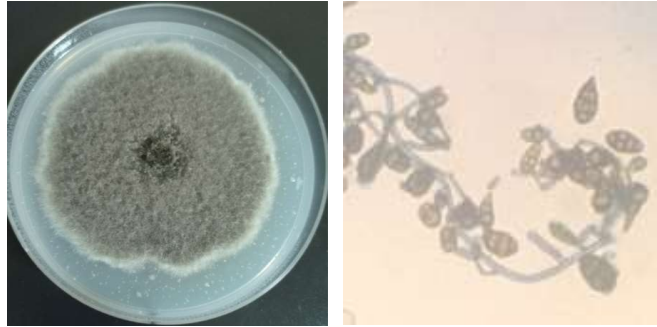


Figure 22. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Tom 1 d'*Alternaria sp.*

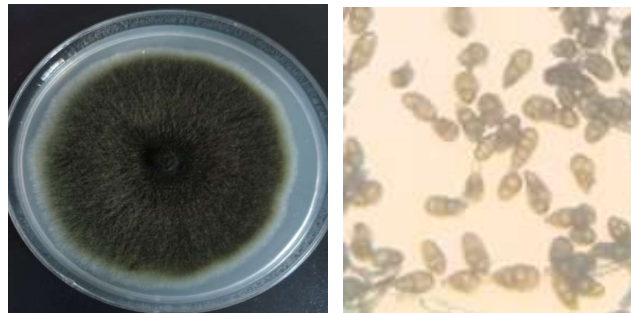


Figure 23. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Tom 2 d'*Alternaria sp.*

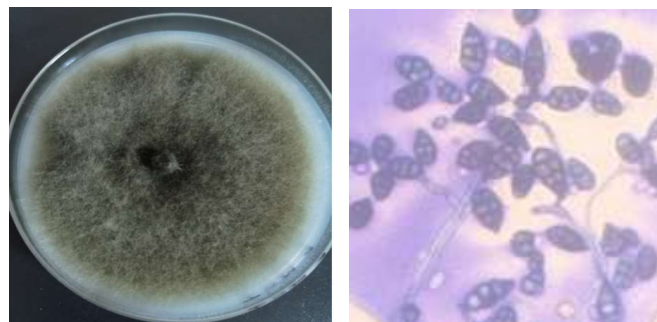


Figure 24. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Tom 3 d'*Alternaria sp.*

Abdel Mallek *et al.*, (1995) ont rapporté qu'*Alternaria* était l'un des plus courants de champignon isolé de la tomate malade, où les isolats d'*Alternaria* étaient les espèces fongiques les plus isolées à partir de fruits pourris et a donné la fréquence d'occurrence la plus élevée (40-70%) ce qui est conforme à notre présent résultat.

Au sein du genre *Alternaria*, la taxonomie est assez complexe et la différenciation des espèces est généralement basée sur une combinaison d'observations morphologiques et moléculaires (**Bessadat *et al.*, 2014**). Cependant, en particulier au sein de l'espèce l'*Alternaria sp.* une grande variation dans les aspects morphologiques a été observée en fonction principalement des conditions de croissance et même avec des méthodes moléculaires, l'identification des espèces reste difficile (**Siciliano *et al.*, 2017**).

D'un autre côté, la plus forte croissance du champignon a été observée 7 jours après l'incubation avec une augmentation de croissance sur le milieu PDA. **Koley et Mahapatra (2015)** ont signalé qu'une croissance maximale d'*Alternaria* infectant la pomme de terre et la tomate est observée après le 7ème jour d'inoculation sur le PDA, ce qui est confirmé par les présents résultats.

Le milieu PDA a permis une bonne croissance d'*Alternaria*, Le milieu PDA a une formulation simple et une teneur en nutriments élevée, ce qui favorise la meilleure croissance mycélienne du champignon. Les mêmes résultats ont été obtenus par Somappa *et al.*, **(2013)** et Koley et Mahapatra **(2015)** qui ont rapporté que le PDA était le meilleur milieu permettant une bonne croissance d'*Alternaria* infectant la tomate.

3. Criblage *in vitro* de l'activité antifongique

La méthode de confrontation directe sur milieu PDA a été utilisée pour tester l'activité inhibitrice des antagonistes fongique et actinomycétales contre les trois phytopathogènes fongiques d'*Alternaria*. Cette méthode est la technique *in vitro* la plus largement utilisée et la plus simple pour déterminer l'activité des agents de lutte biologique contre les agents pathogènes (**Thambugala et al., 2020**).

Parmi les souches fongiques et actinomycétales isolées seules 10 souches ont montré une bonne activité antagoniste contre les souches d'*Alternaria*; dont un antagoniste actinomycétale et neuf antagonistes fongiques. Ces antagonistes sélectionnés ont montré des zones d'inhibition importantes dans le test de confrontation directe. Le reste des isolats n'étaient pas pris en compte car leur effet inhibiteur était faible par rapport aux croissances des souches phytopathogènes (**Figure 26**). Les zones d'inhibition des souches sélectionnées sont mesurées, comparées avec le témoin ainsi le pourcentage d'inhibition de la croissance radiale (PIRG) a été calculé (**Figure 25, Tableau 7**).

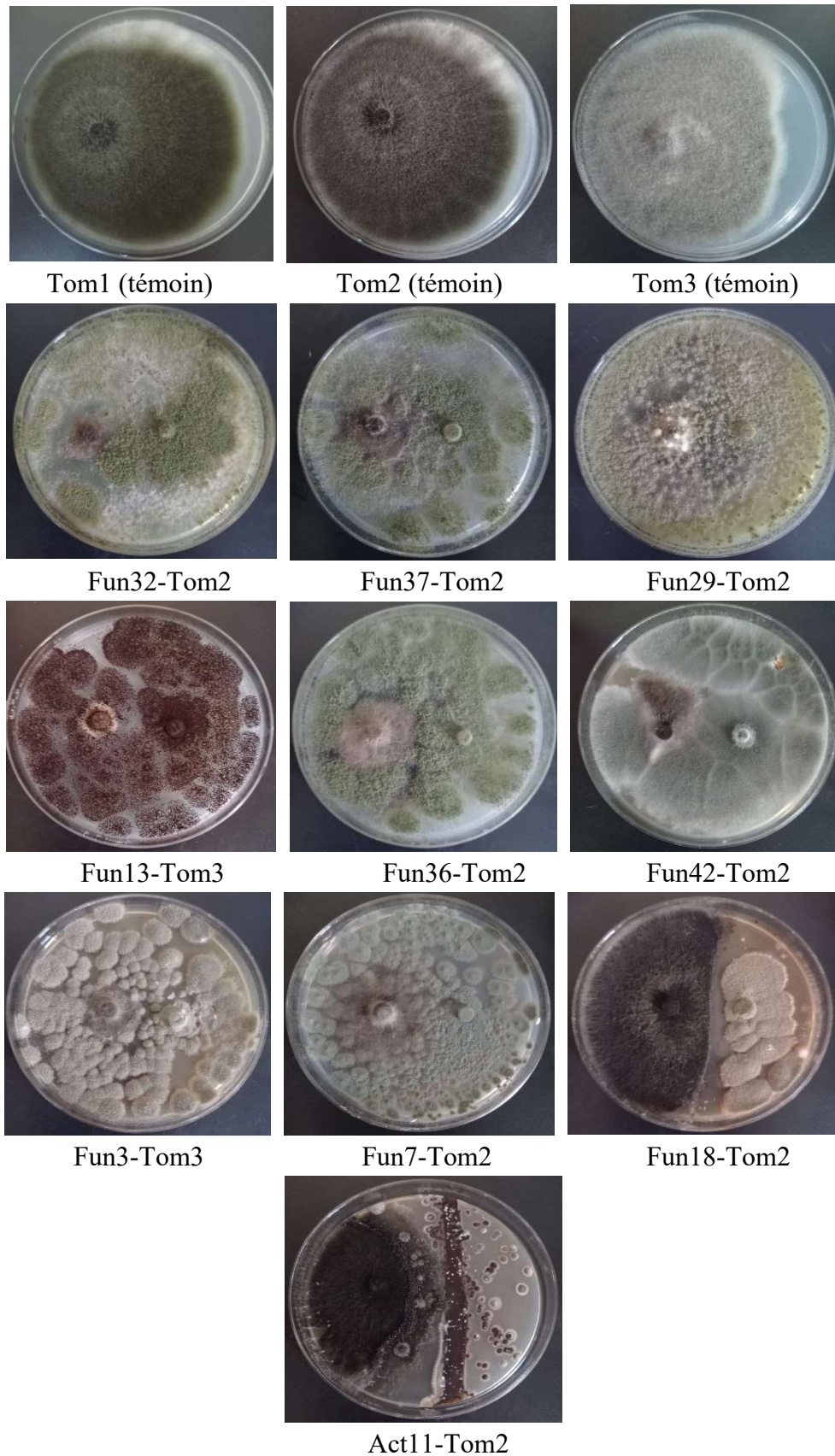


Figure 25. Résultat de la confrontation directe des 10 meilleures souches (Tom : champignon phytopathogène (croissance témoin), Fun : antagoniste fongique, Act : Antagoniste actinomycétale).

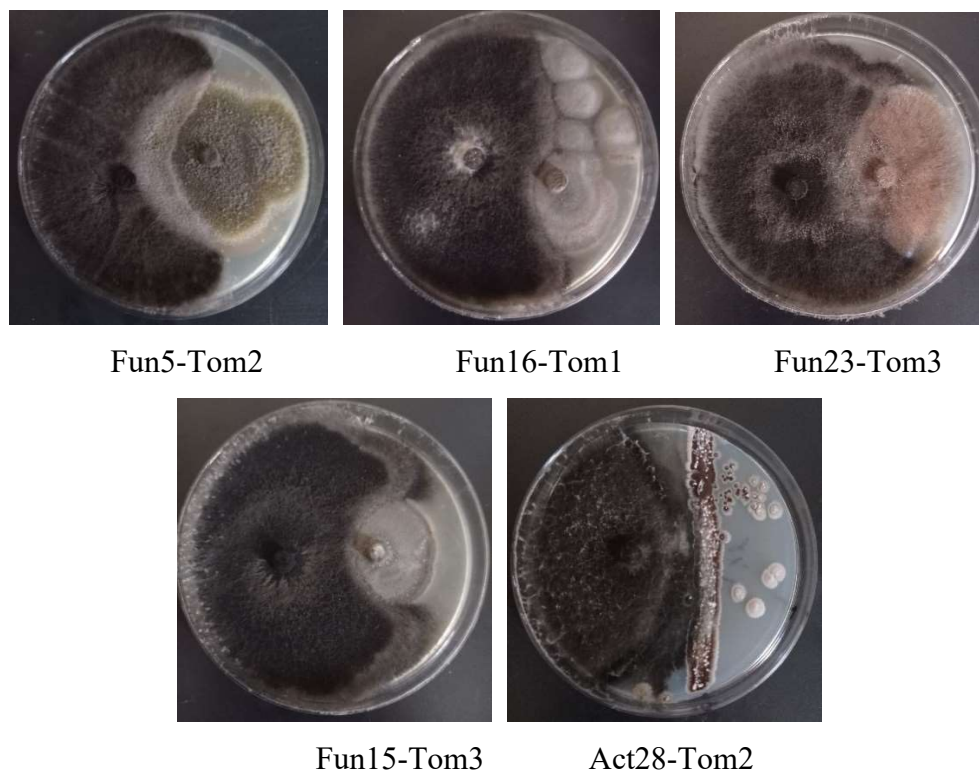


Figure 26. Quelques résultats de la confrontation directe montrant des effets antagonistes faibles (Fun : antagoniste fongique, Act : Antagoniste actinomycétale).

Tableau 7. Résultat de pourcentage d'inhibition de la croissance radiale (PIRG) des 10 meilleures souches

PIRG	Tom1 (%)	Tom2 (%)	Tom3 (%)
Control	-	-	-
Fun3	72,58	50,67	73,85
Fun13	79,03	57,5	84,62
Fun18	35,48	42,67	23,08
Fun7	59,68	73,33	55,56
Fun42	40,32	77,33	46,15
Fun37	72,58	81,33	69,23
Fun29	67,74	86,67	69,23
Fun36	72,58	80	53,85
Fun32	75,81	92	76,92
Act11	14,52	53,33	47,69

Tom : champignon phytopathogène, Fun : antagoniste fongique, Act : Antagoniste actinomycétale.

Les dix isolats antagonistes testés différaient dans leur capacité à inhiber la croissance des divers agents pathogènes d'*Alternaria*. Dans l'ensemble, l'isolat la souche Tom2 était très sensible contre la majorité des isolats antagonistes.

D'après les observations faites à partir des tests de confrontations directes, les antagonistes ont entraîné une réduction significative de la croissance mycélienne des 3 isolats phytopathogènes. Les valeurs d'inhibition les plus élevées variaient entre 73,33% et 92 %. Elles étaient obtenues par les couples antagoniste-phytopathogène Fun32-Tom2 (92%), Fun29-Tom2 (86,67%), Fun13-Tom3 (84,62%), Fun37-Tom2 (81,33%), Fun36-Tom2 (80%), Fun3-Tom 3 (73,85%), Fun42-Tom2 (77,33%) et Fun7-Tom2 (73,33%). Cependant, les deux isolats (Fun18 et Act11) ont montré les valeurs d'inhibition les plus faibles (42,67% et 53,33%, respectivement) (**Tableau 7**).

L'interaction de l'antagoniste et le phytopathogène a montré des différences significatives dans l'inhibition de la croissance des isolats pathogènes. D'après nos résultats, trois cas d'inhibition peuvent être décelés :

- Un premier cas, où une inhibition presque totale de la croissance du pathogène est observé : c'est le cas des couples Fun32-Tom2, Fun13-Tom3, Fun37-Tom2, et Fun29-Tom2 (**Figure 25**).
- Un deuxième cas, où un ralentissement de la croissance du pathogène par rapport au témoin est observé : c'est le cas des couples Fun36-Tom2, Fun3-Tom3, Fun7-Tom2 et Fun42-Tom2 (**Figure 25**).
- Un troisième cas, où une barrière limitant la croissance est observée entre les deux colonies du pathogène et de l'antagoniste : c'est le cas des couples Fun18-Tom2 et Act11-Tom2 (**Figure 25**).

Ces différents cas de figures reflètent des modes d'attaque différents de telle manière où les antagonistes emploient des mécanismes d'antagonistes plus ou moins efficace contre la croissance du phytopathogène *Alternaria*. En effet, certains antagonistes se développent rapidement par rapport aux phytopathogènes. Ils sont capables de proliférer très rapidement dans des conditions favorables, jusqu'à ce qu'ils se développent sur les colonies de l'agent pathogène. **Živković et al., (2010)** ont montré que cette croissance rapide donne un avantage important dans la concurrence pour l'espace et les nutriments avec les champignons pathogènes, avant même qu'ils ne déploient leur arsenal de mycotoxines. En plus de la possibilité d'un mécanisme de compétition, d'autres mécanismes peuvent également être en

cause de ces inhibitions différentielles comme le mycoparasitisme (tels que l'enroulement, l'adhérence et la pénétration par la production des enzymes dégradant) et la production de métabolites extracellulaires (**Siameto *et al.*, 2010**).

Dans le cas de l'apparition d'une zone claire ou une sorte de barrière séparatif entre les mycéliums de l'antagoniste et du pathogène avec souvent l'apparition de pigmentation. Cela peut être interprété par la production d'une ou plusieurs molécules capables d'inhiber la croissance de champignon pathogène. **Brglez *et al.*, (2020)** ont été signalé qu'un ensemble très diversifié de substances bioactives peut être produit lors d'interactions mycéliennes entre l'antagoniste et le phytopathogène et peut avoir un effet inhibiteur par la production de pigment dans la zone d'interaction.


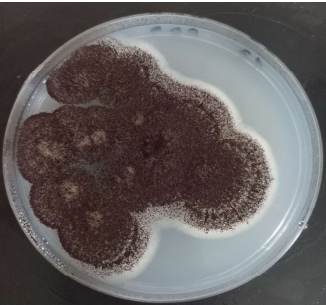

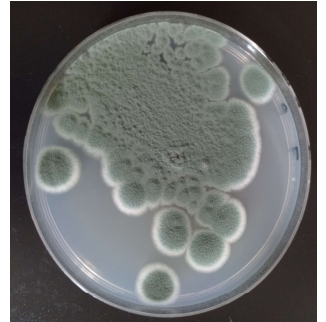
4. Caractérisation des isolats antagonistes sélectionnés

En se basant sur les critères macroscopiques, microscopiques et la capacité de production des enzymes hydrolytiques les antagonistes sélectionnés ont été caractérisés.

4.1. Caractérisation macroscopique

Les antagonistes sélectionnés ont été cultivés sur différents milieux de culture afin de décrire leurs caractères morphologiques. On a utilisé différents milieux de culture : PDA et Sabouraud pour les champignons et les milieux ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP7 et Bennet pour les Actinomycètes. Les tableaux ci-dessous présentent les différents caractères des antagonistes sur les différents milieux de cultures.

Tableau 8. Les caractères culturels des souches antagonistes fongiques sélectionnées sur le milieu PDA.

Code des souches sélectionnées	Aspects macroscopiques des souches sur PDA	Colonie
Fun3	<p>Colonie ronde et petite, de couleur verte blanche, solidement adhérentes à la gélose. Texture veloutée Une croissance lente. Diamètre 45 mm</p>	
Fun13	<p>Colonie noire, granuleuses et arrondies. Une croissance modérée. Diamètres 70 mm.</p>	
Fun18	<p>Colonie ronde, de couleur verte blanche, solidement adhérentes à la gélose. Texture veloutée Une croissance lente Diamètre de 38 mm</p>	
Fun7	<p>Colonie arrondie, de couleur vert-bleuâtre à bordure blanches régulière, cotonneuse. Une croissance modérée Diamètre de 68 mm</p>	


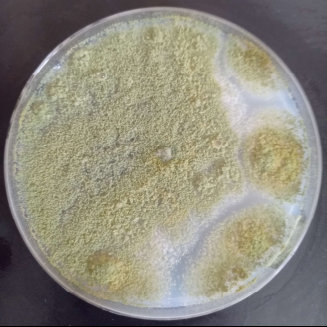
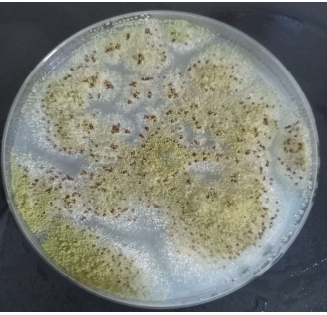
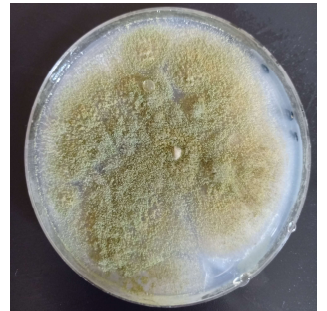
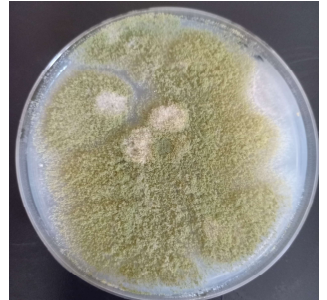

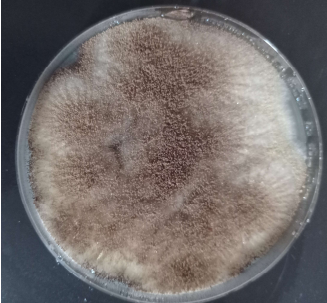







<p>Fun42</p>	<p>Colonie ronde à bordure dentelée, de couleur gris blanc, solidement adhérentes à la gélose. Texture laineuse et veloutée Une croissance modérée. Diamètre 70 mm</p>	
<p>Fun37</p>	<p>Colonie vert olive granuleuses envahissant la boîte de Pétri. Bordures blanches irrégulières. Une croissance rapide. Diamètre 85 mm.</p>	
<p>Fun29</p>	<p>Colonie verte olive granuleuses envahissant la boîte de Pétri. Bordures blanches irrégulières. Une croissance rapide. Diamètre 85 mm. Présence des sclérotés bruns.</p>	
<p>Fun36</p>	<p>Colonie vert granuleuses envahissant la boîte de Pétri. Bordures blanches irrégulières. Une croissance rapide. Diamètre 84 mm.</p>	
<p>Fun32</p>	<p>Colonie verte granuleuses envahissant la boîte de Pétri. Bordures blanches irrégulières. Une croissance rapide. Diamètre 81mm.</p>	

Tableau 9. Les caractères cultureux des souches meilleures fongiques antagonistes sur le milieu Sabouraud.

Code des souches sélectionnées	Aspects macroscopiques des souches sur Sabouraud	Colonie
Fun3	<p>Colonie de couleur gris, solidement adhérentes à la gélose.</p> <p>Une croissance rapide envahissant la boîte de Pétri.</p> <p>Diamètre 85 mm</p>	
Fun13	<p>Colonie marron, granuleuses, arrondies.</p> <p>Une croissance rapide envahissant la boîte de Pétri</p> <p>Diamètres 85 mm.</p>	
Fun18	<p>Colonie ronde, de couleur gris, solidement adhérentes à la gélose.</p> <p>Une croissance lente</p> <p>Diamètre 45 mm</p>	
Fun7	<p>Colonie arrondie, de couleur jaune à bordures blanches, cotonneuses sous forme de feuilles de nénuphar.</p> <p>Une croissance lente</p> <p>Diamètre 45 mm</p>	

<p>Fun42</p>	<p>Colonie arrondie, cotonneuse, de couleur blanche, solidement adhérentes à la gélose. Une croissance modérée. Diamètre 70 mm</p>	
<p>Fun37</p>	<p>Colonie jaune granuleuse. Bordures blanches irrégulières. Une croissance modérée. Diamètre 70mm.</p>	
<p>Fun29</p>	<p>Colonie beige granuleuses envahissant la boîte de Pétri. Bordures blanches irrégulières. Une croissance rapide. Diamètre 86 mm.</p>	
<p>Fun36</p>	<p>Colonie jaune granuleuses envahissant la boîte de Pétri. Bordures blanches irrégulières. Une croissance rapide. Diamètre 84 mm.</p>	
<p>Fun32</p>	<p>Colonie beige granuleuses envahissant la boîte de Pétri. Bordures jaunes irrégulières. Une croissance rapide. Diamètre 86 mm.</p>	

Les résultats des caractères cultureux des moisissures résumés dans les tableaux 8 et 9 en utilisant les milieux de culture PDA et Sabouraud montrent que les souches sélectionnées avaient des caractéristiques morphologiques différentes dans chaque milieu. Les caractéristiques morphologiques, comme la couleur et le diamètre des colonies, l'intensité de la croissance était légèrement différente, en fonction de type du milieu de culture utilisé. Dans un autre côté, on remarque que la croissance du mycélium des souches Fun3, Fun13 et Fun32 étaient significativement meilleure sur Sabouraud par rapport au PDA. Alors que Fun37 et Fun7 croient plus rapidement sur PDA par rapport au Sabouraud. Les souches Fun29, Fun18, Fun36 et Fun42 étaient des souches qui n'ont pas une différence significative de vitesse de la croissance quel que soit le milieu de culture utilisé. Une observation similaire a été faite par **Ali *et al.*, (2016)** qui rapporte que la couleur, la texture, le diamètre et la vitesse de croissance des colonies des champignons étaient fortement influencés par la composition du milieu de culture utilisé. De plus, les variations de couleur de colonie, en particulier chez les moisissures sont l'une des principaux critères largement utilisés pour leur l'identification et la taxonomie qui semble être principalement attribué aux constituants du milieu de culture (**Sharma, 2010**).

Concernant les actinomycètes, l'isolat antagoniste la plus performante Act11 a présenté une bonne croissance sur les milieux ISP2, Bennet et une croissance moyenne sur les milieux ISP7, ISP4 et ISP5, alors qu'une très faible croissance a été observée sur le milieu ISP3. La sporulation était forte sur ISP2, Bennet, et faible sur ISP7, ISP4 et ISP5 et inexistante sur ISP3. Les colonies de l'isolat Act11 présentent un aspect poudreux sec sur les différents milieux de culture avec un diamètre qui varie de 1 à 10 mm, d'une couleur blanche, beige à marron poudré selon le milieu utilisé. Aucun pigment diffusible n'a été observé sur les milieux de cultures utilisés à l'exception du milieu ISP7 où une faible production des pigments mélanoides a été observée (**Tableau 10, Figure 27**).



Figure 27. Caractérisation macroscopique de souche antagoniste actinomycétale Act11 sur différents milieux de culture.

Tableau 10. Résultat de caractérisation macroscopique de la souche antagoniste actinomycétale Act11.

Milieux de culture	Couleur de colonie	Pigmentation	Croissance	Sporulation
ISP2	Beige	-	+++	+++
ISP3	Incolore	-	+	-
ISP4	Marron	-	++	+
ISP5	Blanc	-	++	+
ISP7	Beige	+	++	+
Bennet	Beige	-	+++	+++


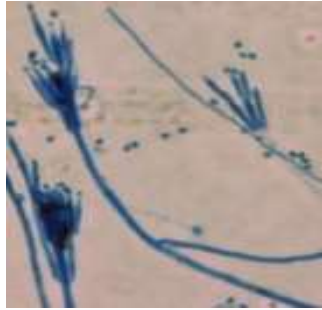
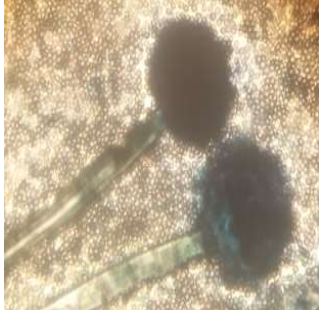
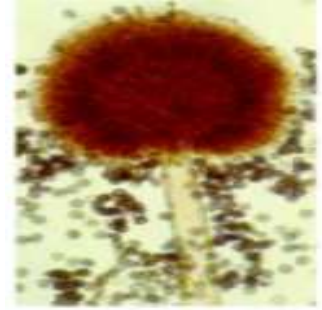
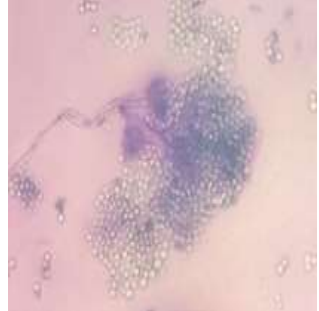
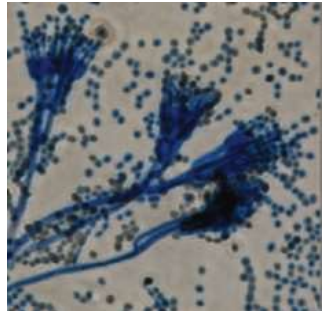


+++ : Bonne, ++ : modérée, + : faible, - : nulle

L'utilisation de différents milieux de culture aide à connaître la capacité de croissance en utilisant différentes sources de carbone. La croissance abondante des colonies d'actinomycètes peut être expliquée par le fait que la source de carbone particulière était efficacement utilisée par l'isolat, comme l'ont également rapporté **Sharma *et al.*, (2014)**. Une croissance légère ou médiocre indique que la source de carbone présente dans le milieu n'est pas une source adéquate pour la souche testée (**Muiru *et al.*, 2008**). Des résultats similaires à nos résultats qui ont été rapportés par **Benhadj *et al.*, (2019)** et **Smaoui *et al.*, (2011)** qui ont trouvé que les milieux ISP2 et Bennet donnent une bonne croissance et une bonne sporulation des actinomycètes spécialement le genre *Streptomyces*, alors que l'ISP3 donne une faible croissance pour les souches isolées.

4.2. Caractérisation microscopique

La caractérisation microscopique est basée principalement sur l'observation des structures caractéristiques des souches sélectionnées (conidiophore, conidies, mycélium...). Les **tableaux 11 et 12** montrent les différents caractères microscopiques observés pour les isolats fongiques et actinomycétales antagonistes les plus performants.

Tableau 11. Résultat de l'observation microscopiques des meilleures souches antagonistes fongiques

Code des souches sélectionnées	Description microscopiques	Observation microscopique	Photo de référence
Fun3	<ul style="list-style-type: none"> -Hyphe : septé, portent des conidiophores -Conidiophore : ramifiés cylindriques, -Phialides : disposées en pinceaux, insérées par l'intermédiaire des métules sur les conidiophores -Conidies : rondes. 		 (Tsang <i>et al.</i> , 2018)
Fun13	<ul style="list-style-type: none"> -Conidiophore : très longs et non cloisonnés -Phialides : insérées sur la vésicule -Conidies : rondes -Tête aspergillaire : radiée. 		 (Billones <i>et al.</i> , 2020)
Fun18	<ul style="list-style-type: none"> -Hyphe : septé, portent des conidiophores -Conidiophore : ramifiés cylindrique, -Phialides : disposées en pinceaux, insérées par l'intermédiaire des métules sur les conidiophores -Conidies : rondes 		 (Tsang <i>et al.</i> , 2018)
Fun7	<ul style="list-style-type: none"> -Conidiophore : court. -Phialides sur la vésicule ou sur des métules. -conidies : globuleuses. - tête aspergillaire : en colonne 		 (Gautam et Bhadauria, 2012)

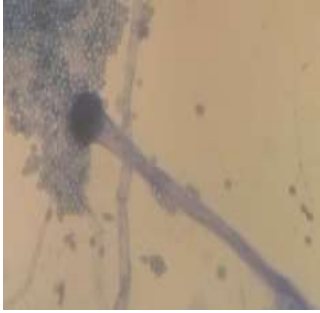
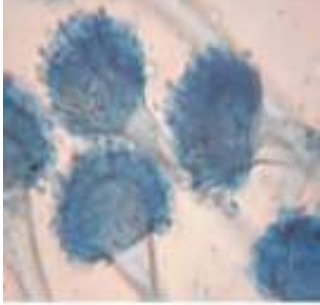

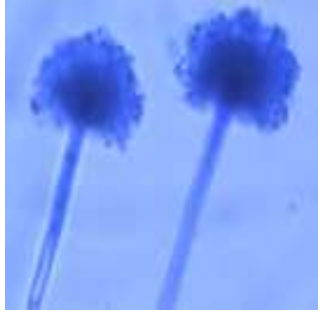

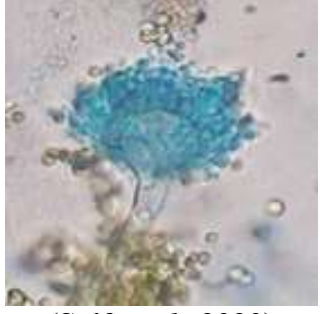
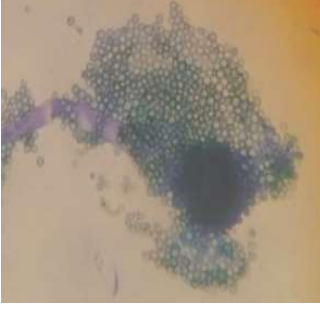
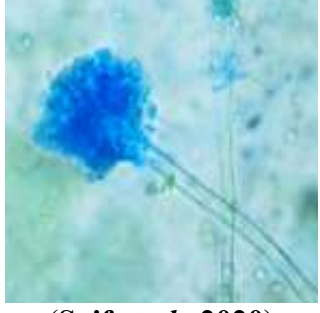
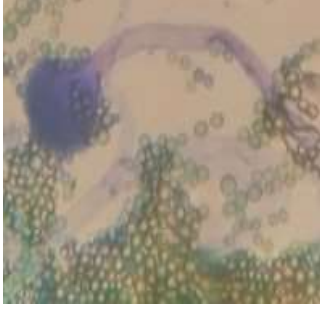


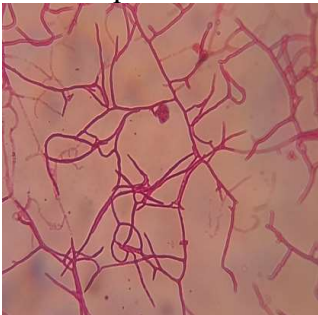
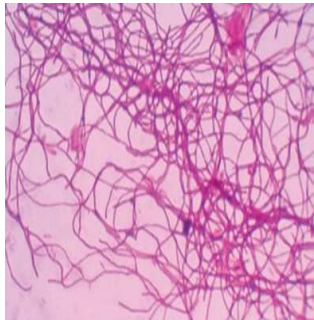
<p>Fun42</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Conidiophore : long. -Phialides sur la vésicule. -conidies : rondes. - tête aspergillaire : en colonne sous forme d'éventail. 		 <p>(Gautam et Bhaduria, 2012)</p>
<p>Fun37</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Conidiophore : longs et non cloisonné -Phialides : portées par des métules insérées sur la vésicule -Conidies : globulaires -Tête aspergillaire : radiée. 		 <p>(Sivaraman et al., 2018)</p>
<p>Fun29</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Conidiophore : court. -Phialides sur la vésicule ou sur des métules. -conidies : globuleuses. - tête aspergillaire : en colonne 		 <p>(Saif et al., 2020)</p>
<p>Fun36</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Conidiophore : court. -Phialides sur la vésicule ou sur des métules. -conidies : globuleuses. - tête aspergillaire : en colonne 		 <p>(Saif et al., 2020)</p>
<p>Fun32</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Conidiophore : court. -Phialides sur la vésicule ou sur des métules. -conidies : globuleuses. - tête aspergillaire : en colonne 		 <p>(Saif et al., 2020)</p>

Tableau 12. Résultat de l'observation microscopiques de la meilleure souche antagoniste actinomycétale

Souche	Description	Coloration de Gram	Photo de référence
Act11	<ul style="list-style-type: none"> -Gram+. -une forme filamenteuse fines. -Un mycélium aérien met en évidence des hyphes fins, ramifiés, non septés. -Un mycélium de substrat long, non fragmenté. 	 <p>Technique de lamelle :</p> 	 <p>(Khadayat <i>et al.</i>, 2020)</p>

Selon la caractérisation macroscopique et microscopique et la comparaison avec la littérature bibliographique, on constate que les 7 souches fongiques Fun13, Fun7, Fun29, Fun32, Fun36, Fun37, Fun42 semblent appartenir au genre *Aspergillus*. L'identification de ce genre est basée principalement sur la présence d'une tête aspergillaire, conidiophores large et non cloisonnés, et contiennent des phialides qui produisent des conidies (Chabasse *et al.*, 2002).

Cependant, les souches Fun3 et Fun18 semblent appartenir au genre *Penicillium*. Les conidies produites par des phialides sont groupées en verticilles à l'extrémité non dilatée d'un conidiophore cloisonné, ces derniers sont disposés sous forme de pinceau (Chabasse *et al.*, 2002).

Le genre *Penicillium* est l'un des champignons les plus communs trouvés dans le sol. Certaines espèces de *Penicillium* produisent du phosphore solubilisé, des sidérophores et des phytohormones telles que l'acide indole acétique et l'acide gibbérellique, des enzymes dégradants la paroi et des molécules bioactives antimicrobiennes, qui sont importants pour la santé des plantes et dans la lutte contre ses ravageurs (Park *et al.*, 2020).

Les champignons du genre *Aspergillus* sont parmi les plus connus. Ils sont répandus dans l'environnement et poussent bien dans des conditions riches et faibles en nutriments. Les *Aspergillus* poussent abondamment sous forme de saprophytes dans les sols. Les recherches

antérieures se sont concentrées sur les espèces d'importance économique et sanitaire pour leur production d'enzymes, produits chimiques de base et produits alimentaires tels que l'acide citrique, α -galactosidase et amylase. Ils ont aussi fait l'objet de recherches comme agents de lutte biologique pour lutter contre les ravageurs de plante (Ngo *et al.*, 2021).

D'un autre côté, d'après les caractéristiques macroscopiques et microscopiques de la souche actinomycétale Act11, il est possible de la rattacher au genre *Streptomyces*, tel qu'il est rapporté par Al-Saadi *et al.*, (2013) et Li *et al.*, (2016) qui ont montré que le genre *Streptomyces* forme de longues chaînes violets (Gram+). Ces chaînes ont différents types de structures porteuses de spores : droites et flexibles. Chaiharn *et al.*, (2020) montrent que les colonies colorées dans différents milieux de culture, produisent des pigments, filamenteuses et difficiles à prélever dans les milieux de culture, caractéristique du genre *Streptomyces*.

Les membres de *Streptomyces* sont largement distribués dans le sol, sont bien connus pour leur capacité à produire une variété de composés bioactifs avec différentes bio-activités telles que des propriétés antibactériennes. Les souches de *Streptomyces* ont également des applications importantes dans le domaine agricole grâce à leur potentiel de lutte biologique contre les phytopathogènes, en particulier les champignons phytopathogènes (Law *et al.*, 2017).

4.3. Caractérisation de l'activité enzymatique

Il est bien connu que les actinomycètes et les champignons produisent couramment des enzymes dégradant les parois cellulaires pour entraver la croissance d'autres micro-organismes (Gajera et Vakharia, 2012 ; Swiontek *et al.*, 2014). De plus, nos résultats ont prouvé que les dix isolats sélectionnés ont montré la capacité à produire différentes enzymes impliquées soit dans l'hydrolyse de la paroi cellulaire ou dans l'altération de processus de virulence chez les champignons phytopathogènes.

4.3.1. Activité protéolytique

L'activité protéolytique des meilleures souches antagonistes a été testé sur le milieu gélose au lait. L'observation des résultats était possible après une incubation de 3 à 5 jours sous forme de zones de lyse visibles qui se traduisent par une production de l'enzyme protéase (Figure 28).

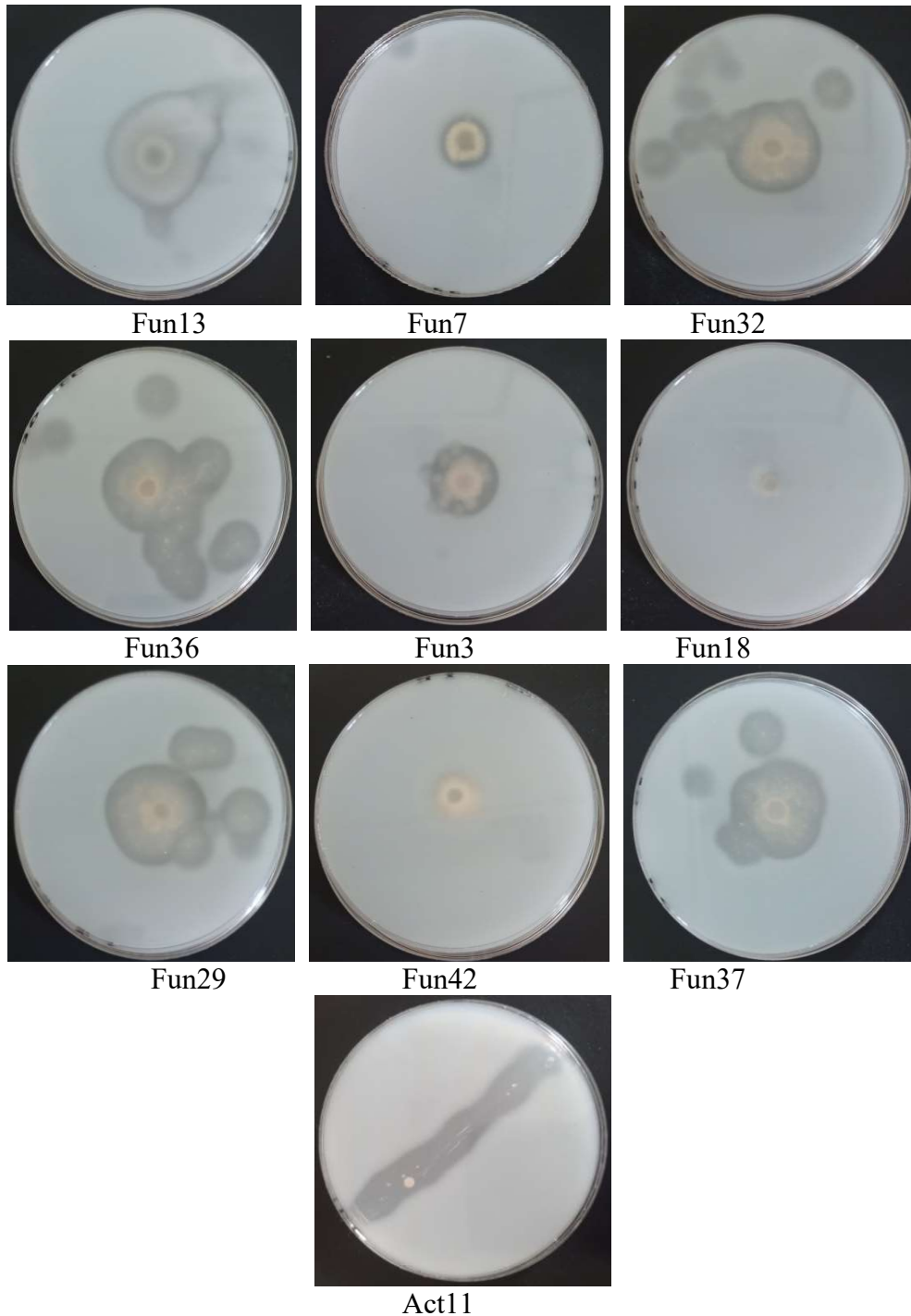


Figure 28. Résultat de l'activité protéolytique des meilleures souches antagonistes.

Les résultats ont montré que les isolats Fun18 et Fun42 ne présentaient aucune activité protéolytique, puisqu'aucun halo de dégradation n'a été observé après 7 jours d'incubation. En revanche, les autres isolats ont été capables de produire des enzymes qui dégradent la caséine du lait écrémé présent dans le milieu de culture. Des halos transparents ont pu être observés autour des colonies productives de la protéase (**Figure 28**). L'isolat actinomycétale Act11 a présenté l'indice enzymatique le plus important qui est de 2,5. De côté des isolats fongiques, la meilleure activité protéolytique a été observée chez Fun37 avec un indice enzymatique de

1,26 (**Tableau 13**). Selon la littérature, les isolats présentant des indices enzymatiques supérieurs à 2,0 sont considérés comme de bonnes souches productrices de protéases (**Baggio et al., 2019**).

Tableau 13. Résultat de l'activité protéolytique des meilleures souches antagonistes.

Code de souche	Diamètre de la zone de lyse (mm)	Diamètre de la colonie (mm)	Indice enzymatique
Fun3	27	25	1,08
Fun7	12	12	1
Fun13	28	25	1,12
Fun18	-	-	-
Fun29	33	29	1,13
Fun32	32	28	1,14
Fun36	36	31	1,16
Fun37	42	34	1,24
Fun42	-	-	-
Act11	5	2	2,5

Les protéases (des enzymes qui catalysent le clivage des liaisons peptidiques dans les protéines) produites par les microbes antagonistes jouent un rôle important dans leur activité de biocontrôle. Ces enzymes ont la capacité de dégrader la paroi des champignons phytopathogènes. Le rôle de ces enzymes dans la protection des plantes contre les champignons phytopathogènes a été déjà démontré par plusieurs chercheurs. Cette enzyme est impliquée dans la dégradation des parois cellulaires, des membranes et même des protéines pathogènes libérées par la lyse de l'agent pathogène (**Elad et Kapat, 1999**). Un grand nombre de souches fongiques ont été utilisées pour produire des protéases. Ces souches appartiennent principalement aux genres : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola*, *Thermoascus* et *Thermomyces*. Les protéases microbiennes des espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium*, en particulier, ont été étudiées en détail car elles sont connues pour leur capacité à intervenir dans l'attaque des champignons phytopathogènes (**Souza et al., 2015**).

Les espèces du genre *Penicillium* connues pour leur capacité productrice de protéase comprennent *Penicillium* sp., *P. camemberti*, *P. citrinum*, *P. griseoroseum*, *P. restrictum* et *P. roqueforti*. La plupart des champignons *Penicillium* produisent des protéases alcalines. Cependant, *P. griseoroseum* et *P. camemberti* sont connus pour produire des protéases acides (**Baggio et al., 2019**). Aussi, *Aspergillus niger*, *A. oryzae* et *A. flavus* sont des espèces largement utilisées dans la production de protéase à grande quantité (**Souza et al., 2015**).

D'un autre côté, les espèces d'actinomycètes en particulier les *Streptomyces* ont déjà été signalés comme provoquant une lyse des hyphes et un mycoparasitisme lors d'une interaction directe avec des champignons pathogènes (**Palaniyandi et al., 2013**). La capacité de produire une variété d'enzymes protéolytiques est un phénomène bien connu chez les actinobactéries mésophiles. Les protéases de *Streptomyces*, y compris la « pronase 7M » (*S. griseus*) et la « fradiase 7M » (*S. fradiae*) sont commercialement utiles. Alors que les protéases alcalines largement caractérisées sont celles de *S. nigellus*, *S. albidoflavus* et d'autres genres comme *Nocardiopsis*, *Thermomonospora* et *Thermoactinomyce* (**Vaijyanthi et al., 2016**).

4.3.2. Activité cellulolytique

L'activité cellulase est basée sur la culture des souches sélectionnées sur un milieu à base de carboxyméthyl cellulose (CMC). Après l'incubation de 3 à 5 jours, l'activité cellulolytique est révélée par l'ajout d'une solution d'iode qui laisse apparaître une zone claire signifiant la dégradation de la cellulose par la cellulase extracellulaire.

D'après la **figure 29**, on remarque que toutes les souches sélectionnées sont capables de croître sur le milieu gélosé à base de CMC en dégradant la seule source carbone disponible dans ce milieu qui est la cellulose. Cette constatation est reflétée par l'apparition d'une zone claire autour des colonies. Le **tableau 14** représente les indices enzymatiques liés à l'activité cellulolytiques des souches étudiées.

Tableau14. Résultat de l'activité cellulolytique des meilleures souches antagonistes.

Code de souche	Diamètre de la zone de lyse (mm)	Diamètre de la colonie (mm)	Indice enzymatique
Fun3	30	15	2
Fun7	22	12	1,83
Fun13	40	40	1
Fun18	35	15	2,33
Fun29	46	25	1,84
Fun32	56	41	1,36
Fun36	70	55	1,27
Fun37	50	45	1,11
Fun42	30	30	1
Act11	9	7	1,29

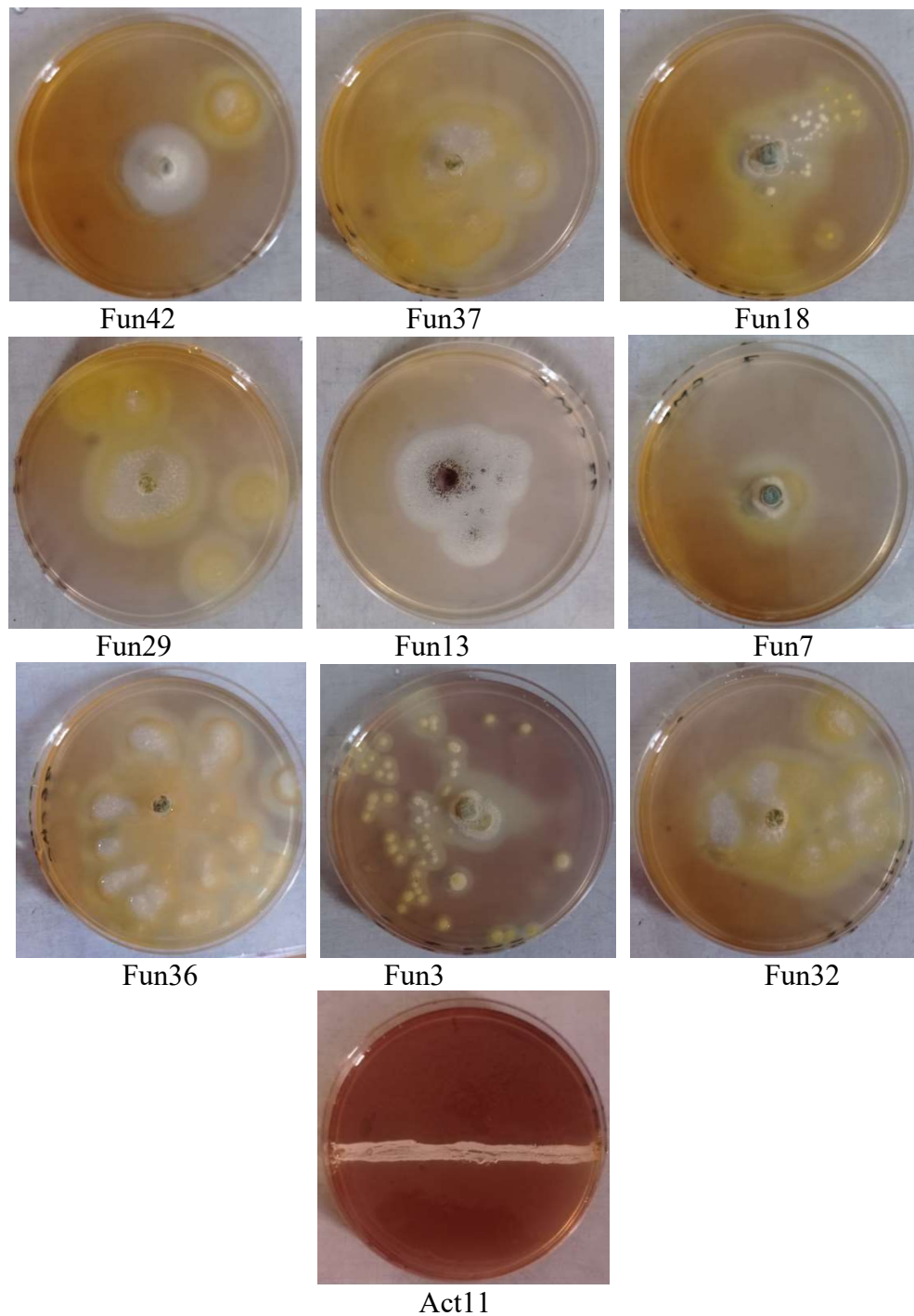


Figure 29. Résultat de l'activité cellulolytique des meilleures souches antagonistes

D'après le **tableau 14**, on remarque que toutes les souches sont capables de produire l'enzyme cellulase en présentant un diamètre d'une zone claire autour de leurs colonies, plus aux moins important selon la souche. Ainsi les souches Fun18 et Fun3 avaient un rapport d'activité enzymatique plus important que les autres souches, ces souches sont considérées comme des souches très actives par rapport à l'activité cellulolytique. Contrairement aux premières, les souches Fun13 et Fun42 avaient les indices enzymatiques les plus faibles, et sont donc considérées faiblement actives.

Dans notre étude, les souches fongiques d'*Aspergillus* et *Penicillium*, ainsi que la souche actinomycétale sont capables de produire la cellulose en dégradant le CMC. Des résultats similaires ont été rapportés par **Ahmad et al., (2021)** qui ont trouvé que les espèces d'*Aspergillus* (*A. terreus*, *A. flavus*, *A. niger* et *A. fumigatus*) et l'espèce *Penicillium chrysogenum* isolées à partir de sol sont capables de produire la cellulase. De même, **Zhao et al., (2013)** ont trouvé que les actinomycètes en particulier les *Streptomyces* sont capables de dégrader le CMC par la production de cellulase. De leur côté, **Imran et al., (2016)** ont rapporté que les espèces de *Streptomyces* (*S. lividans* et *S. drozdowiejii*), *Cellulomonas* (*C. uda*, *C. fimi* et *C. bioajotea*) et *Thermonospora* (*T. curvata* et *T. fusca*) sont des productrices actives.

Pour mieux comprendre l'implication de la cellulase dans le biocontrôle, il faut remonter au point de départ et comprendre que les plantes sont résistantes à la plupart des microbes pathogènes grâce à leur immunité innée, et le mécanisme de défense peut se produire localement au site d'infection et de manière systémique (**Gozzo, 2003**). En fonction des blessures, les plantes peuvent activer leur résistance de deux manières différentes : la résistance systémique acquise (SAR) et la résistance systémique induite (ISR) (**Zipfel, 2014**). Les plantes utilisent le SAR pour limiter l'expansion des agents pathogènes dans les tissus systémiques en induisant une nécrose au site local lors de l'infection primaire (**Durrant et Dong, 2004**).

Fait intéressant, l'ISR n'est pas seulement initiée par des agents pathogènes, mais est également induite par l'interaction avec des microbes mutualistes ou favorisant la croissance des plantes (PGPR) (**Djonovic et al., 2006**). Dans le système ISR, la signalisation de la réponse de défense est généralement capable de passer du système racinaire souterrain à la partie aérienne pour protéger la plante des maladies. Il a été démontré que la cellulase de *Trichoderma harzianum* Th22 interagit avec la racine de maïs en activant un système de signalisation mal connu qui finira par l'induction de la résistance systémique (ISR) contre les maladies foliaires (**Saravanakuma et al., 2016**).

Une autre étude a montré que les gènes de cellulase tels que *Thph1* et *2* étaient impliqués dans le contrôle biologique de *Fusarium* et de ses maladies végétales par l'activation des expressions géniques liées à la défense immunitaire dans la racine de maïs (**Saravanakuma et al., 2018**).

4.3.3. Activité amylolytique

Nous avons utilisé le milieu à base d'amidon pour tester l'activité amylyase des souches sélectionnées afin de déterminer leur capacité de produire cette enzyme importante dans le

domaine de biocontrôle. Après la période d'incubation, nous avons utilisé la révélation par la solution d'iode pour révéler la zone claire et la zone de croissance (**Figure 30**). L'amidon formera un complexe bleu foncé avec l'iode. L'amidon hydrolysé provoquera la décomposition du complexe amidon-iode pour former une zone claire, l'absence de zones claires autour des colonies indique une réaction entre les réactifs iodés et les amidons non hydrolysés dans le milieu (**Sukmawati *et al.*, 2019**).

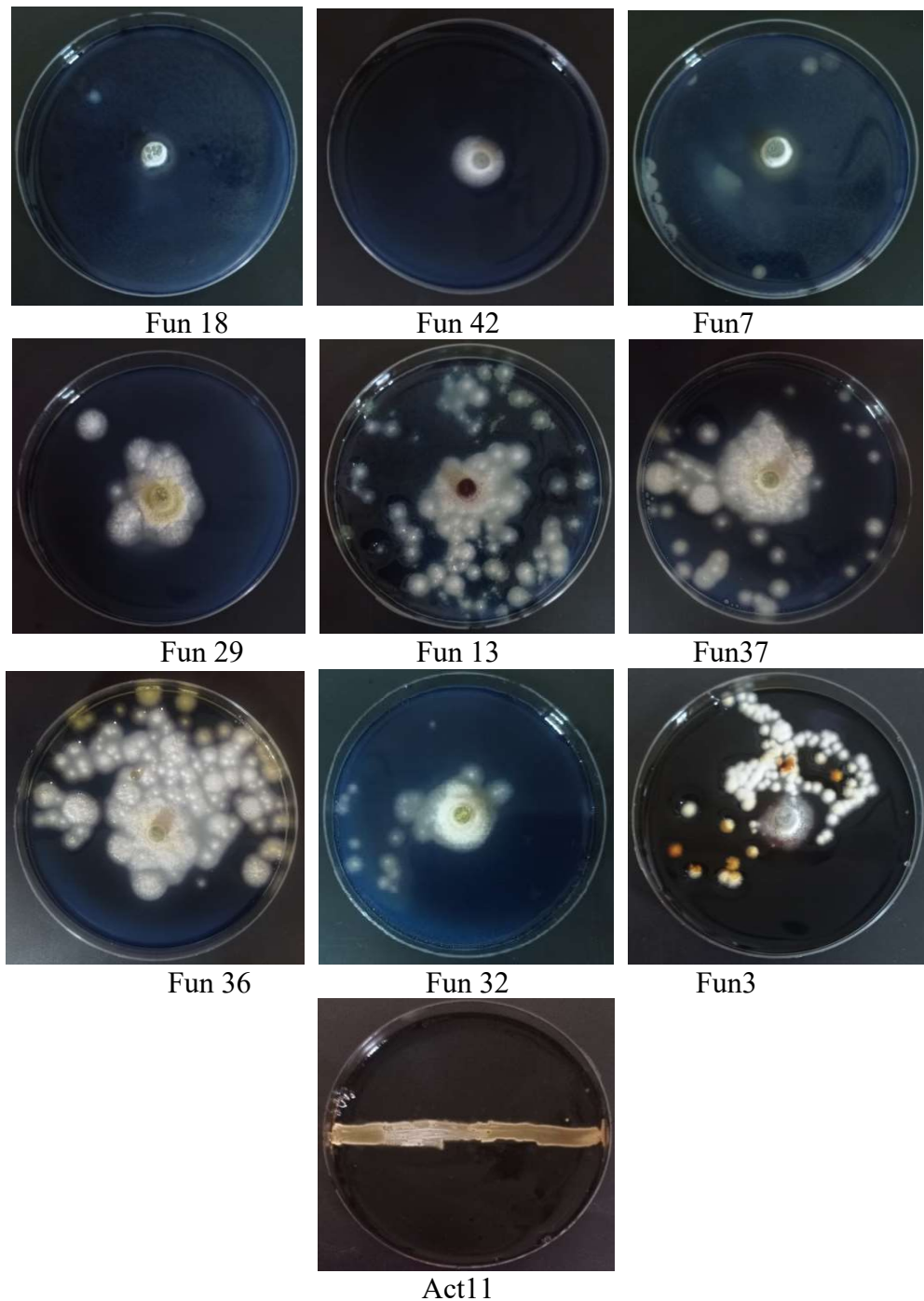


Figure 30. Résultat de l'activité amyolytique des meilleures souches antagonistes

D'après la **figure 30**, on observe que toutes les souches sélectionnées sont capables de croître sur le milieu gélosé à base de l'amidon par l'apparition d'une zone claire après révélation, elles ont utilisé l'amidon pour leur croissance et par conséquent elles ont produit l'enzyme amylase dégradant l'amidon. La souche Fun13, Fun36 et Fun 37 envahissent la boîte de Pétri juste après 3 jours par la croissance de plusieurs colonies. La zone de lyse est différente selon la souche utilisée et par conséquent le rapport de l'activité amylolytique est différent, reflétant le potentiel amylolytique de chaque souche

Tableau15. Résultat de l'activité amylolytique des meilleures souches antagonistes

Code de la souche	Diamètre de la zone de lyse (mm)	Diamètre de la colonie (mm)	Rapport
Fun3	15	11	1,36
Fun7	16	10	1,6
Fun13	Envahissement	Envahissement	Envahissement
Fun18	14	9	1,56
Fun29	35	28	1,25
Fun32	26	20	1,30
Fun36	Envahissement	Envahissement	Envahissement
Fun37	Envahissement	Envahissement	Envahissement
Fun42	18	13	1,38
Act11	0,8	0,8	1

D'après le **tableau 15**, en comparant l'indice de l'activité enzymatique, on trouve que les souches Fun7 et Fun18 avaient le plus fort indice (1,6 et 1,56 respectivement), les souches Fun13, Fun36, Fun37 ont envahi les boîtes, ces souches sont considérées comme des souches très actives capable de produire l'amylase avec une quantité importante, cependant les souches Act11, Fun 29 produisent faiblement l'amylase.

. La souche *Aspergillus awamori nakazawa* a été signalé comme un producteur efficace de l'amylase dans la fermentation à l'état solide avec du blé comme substrat (**Sethi et al., 2016**). *Aspergillus niger* a été signalé aussi comme l'un des meilleurs producteurs commerciaux d' α -amylase (**Khan et Yadav, 2011**). Les amylases produites par *Aspergillus niger* sont connus pour avoir une large gamme d'activité de pH et de thermostabilité qui convient à des fins industrielles (**Angelia et al., 2019**). *Penicillium chrysogenum* et *Penicillium digitatum* ont été utilisés à grande échelle dans les industries pour la production d'amylase (**Dar et al., 2015 ; Onofre et al., 2016**). L'amylase du genre de *Streptomyces* est considérée comme une source active d'amylases. Notamment, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces* sp. SLBA-08, *Streptomyces* souche A3, et *Streptomyces rochei* BTSS 1001 qui sont utilisés pour la production d'amylase (**Rengasamy et Thangaprakasam, 2018**).

Contrairement à la chitinase et à la cellulase, l'amylase extracellulaire sécrétée par les microorganismes ne peut pas détruire les parois cellulaires des phytopathogènes (Trust, 1975). Dans l'interaction entre de nombreuses plantes et microorganismes, les sucres extracellulaires jouent un rôle important et participent au processus d'adhésion microbienne à la surface racinaire et de colonisation dans les racines (Matthyse, 2005). Santaella *et al.* (2008) ont prouvé que les sucres extracellulaires sont nécessaires à la colonisation racinaire de la bactérie de la rhizosphère *Rhizobium* sp. YAS34 chez arabidopsis et colza. Il est bien connu que l'amylase peut hydrolyser l'amidon pour obtenir des nutriments tels que le glucose, le maltose et la maltodextrine, qui peuvent répondre aux besoins de croissance des microorganismes (Bhaskar, 2007). En conséquence, Huang *et al.*, (2022) ont émis l'hypothèse que la colonisation réduite de la souche mutante pour le gène de l'amylase *amyS* pourrait être liée à l'utilisation des nutriments de l'hydrolyse de l'amidon. Ils ont donc mesuré les modifications de la capacité de colonisation microbienne après l'ajout d'hydrolysats d'amidon tels que le glucose, le maltose et la maltodextrine. Leurs recherches ont montré que l'ajout d'amylase extracellulaire et d'amidon favorisait la colonisation du mutant *amyS* dans les racines de blé. Cela indique que l'amylase extracellulaire peut également affecter sa colonisation dans les racines des plantes en hydrolysant l'amidon pour produire du glucose et d'autres substances.

En plus, en cas de carence en nutriments, les microorganismes produisent et sécrètent diverses enzymes dégradantes, telles que les amylases, les protéases et les phospholipases, qui sont utilisées pour dégrader les substances macromoléculaires à l'extérieur des cellules afin d'obtenir des nutriments pour répondre à leurs besoins nutritionnels et améliorer leur adaptabilité à l'environnement (Prashar *et al.*, 2014). Par conséquent, la capacité de ces microorganismes de lutte biologique à produire des enzymes de dégradation extracellulaires dans certaines conditions est très importante dans le phénomène de compétition pour les nutriments.

4.3.4. Activité pectolytique

L'activité pectinolytique est testée sur un milieu de culture gélosé de gélose à base de pectine. Après révélation par la solution d'iode, une zone claire apparaît autour des colonies indiquant la production de pectinase qui dégrade la pectine (Figure 31, Tableau 16).

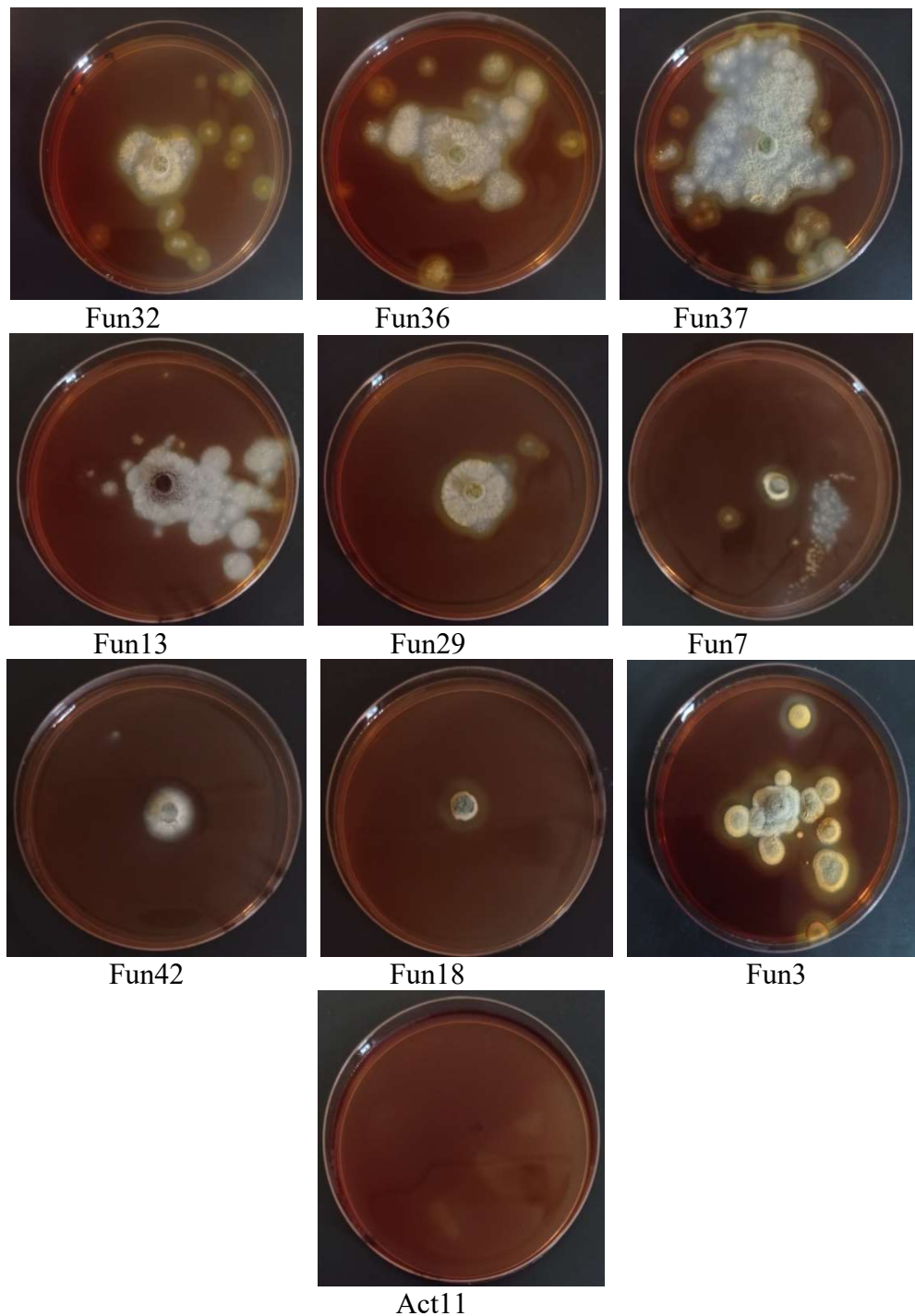


Figure 31. Résultat de l'activité pectinase des souches sélectionnées.

D'après le résultat de **figure 31**, on observe que toutes les souches sélectionnées sauf la Act11 sont capables de croître sur le milieu gélosé à pectine par l'apparition d'une zone claire après l'ajout de solution d'iode, elles ont donc produit l'enzyme pectinase dégradant la pectine. La souche Fun 37 envahit la boîte de Pétri juste après 3 jours.

Tableau 16. Résultats de l'activité pectinase des meilleures souches antagonistes

Code de souche	Diamètre de zone de lyse (mm)	Diamètre de colonie (mm)	Rapport
Fun3	38	30	1,27
Fun7	14	8	1,75
Fun13	27	25	1,08
Fun18	16	9	1,78
Fun29	29	23	1,26
Fun32	35	25	1,40
Fun36	32	25	1,28
Fun37	Envahissement	Envahissement	Envahissement
Fun42	14	12	1,17
Act11	-	-	-

D'après le **tableau 16**, en comparant l'indice de l'activité pectinolytique, on trouve que les souches Fun7 et Fun18 avaient la plus forte activité (1,75 et 1,78, respectivement) et la souche 37 qui envahit la boîte sont considérées comme des souches très actives, cependant les souches Fun 13 et Fun42 ont un indice faible (1,08 et 1,17 par ordre). Alors qu'une croissance est observée pour la souche Act11.

Les pectinases sont constituées de plusieurs unités qui favorisent la dégradation de la pectine qui sont des polysaccharides structuraux complexes d'origine végétale qui contiennent une grande proportion de sous-unités d'acide galacturonique partiellement liées par des liaisons α -1,4-glycosidiques (El Gamal *et al.*, 2018)

La pectinase semble induire très efficacement des réactions de défense des plantes probablement par la libération de fragments pectiques qui pourraient jouer le rôle d'éliciteurs endogènes. Cette enzyme a pour rôle de prévenir l'infection des plantes causée par un agent pathogène. Les microbes producteurs de pectinase sont impliqués dans la promotion de la croissance des plantes en prévenant les infections fongiques (El Gamal *et al.*, 2018).

Nous avons trouvé que le genre *Aspergillus* et *Penicillium* produisent l'enzyme pectinase. Nos résultats sont en accord avec les travaux des auteurs **Khatiri *et al.*, (2015)** et **Almowalled *et al.*, (2020)** qui disent que les espèces d'*Aspergillus* (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*) et de *Penicillium* (*Penicillium viridicatum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium oxalicum*) sont principalement utilisées pour la production de pectinase. Mais contrairement à nos résultats **Govindaraji et vuppu, (2020)** ont trouvé que les pectinases sont produites par plusieurs espèces de *Streptomyces* telles que *S.lydicus* et *S. fumigatiscleroticus*. Dans ce cas, n peut supposer l'hypothèse que notre espèce est probablement mutée pour le gène codant pour la pectinase.

4.3.5. Activité lipolytique et estérolitique

L'activité lipolytique est testée sur un milieu gélosé qui contient la tween 20 ou tween 80. La zone de précipité apparait autour des colonies signifie la production de lipase.

La dégradation du tween produit des acides gras qui en se liant au Ca^{2+} contenu dans le milieu forment des cristaux insolubles. La tween 80 est utilisée pour la mise en évidence des lipases car elle contient des esters d'acide oléique, alors que la Tween 20 est utilisée pour les estérases car elle contient des esters d'acides gras à chaîne inférieure (**Ramnath *et al.*, 2017**).

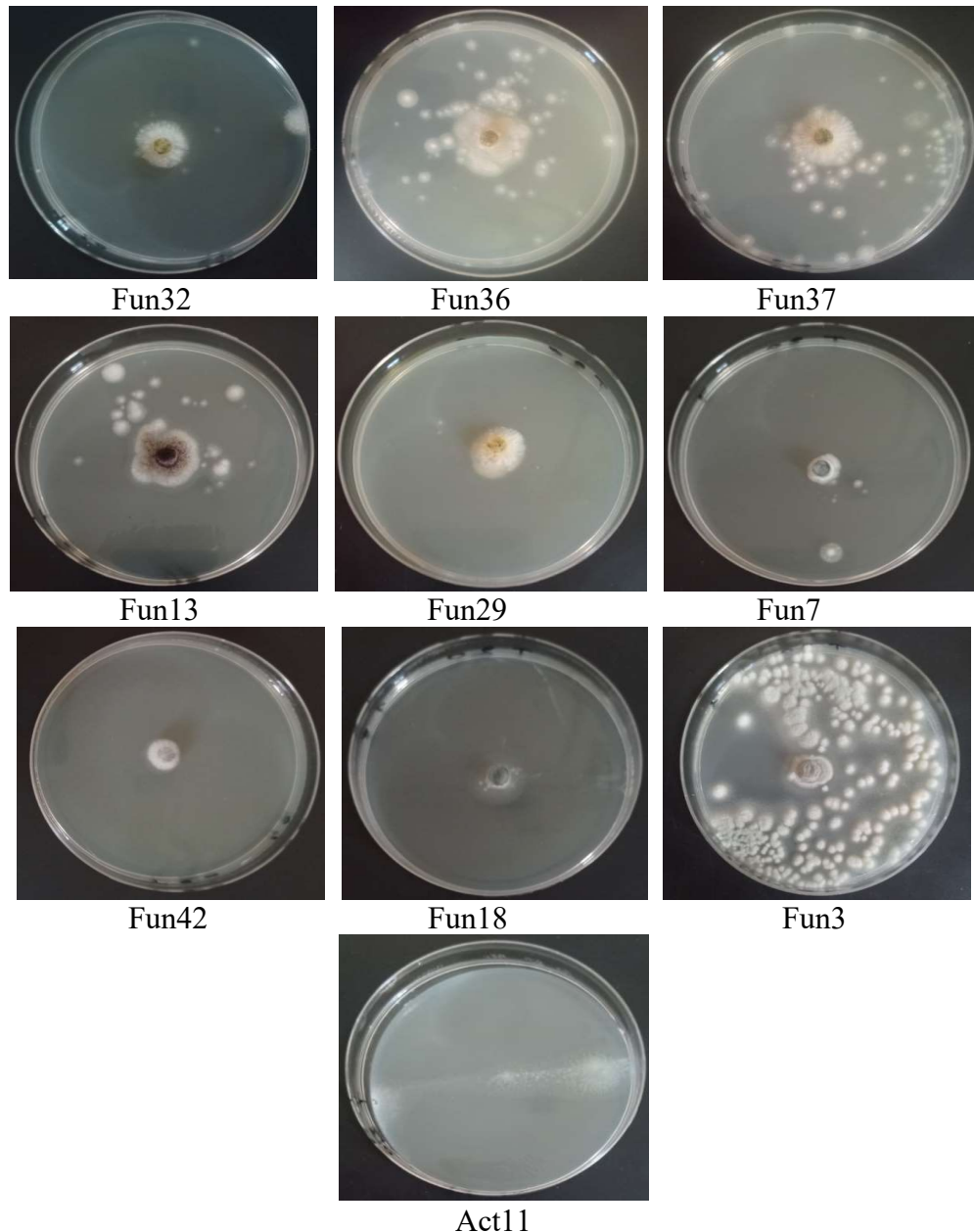


Figure 32. Résultats de l'activité estérolitique des souches sélectionnées.

D'après le résultat de **figure 32**, on observe que toutes les souches sélectionnées sont capables de croître sur le milieu gélosé à 1% de tween 20 par l'apparition d'une zone de

précipité, elles ont donc produit l'enzyme estérase dégradant la tween 20. Le rapport de l'activité enzymatique est calculé et résumé dans le tableau 17.

Tableau 17. Résultats de l'activité estérolytique des meilleures souches antagonistes souches

Code de souche	Diamètre de zone de lyse (mm)	Diamètre de colonie (mm)	Rapport
Fun3	Envahissement	Envahissement	Envahissement
Fun7	11	11	1
Fun13	28	20	1,4
Fun18	13	9	1,44
Fun29	21	19	1,11
Fun32	22	12	1,83
Fun36	25	22	1,14
Fun37	24	20	1,20
Fun42	14	13	1,08
Act11	6	3	2

D'après le **tableau 17**, en comparant les indices de l'activité enzymatique calculés, on trouve que les souches Act11, Fun3 et Fun32 avaient les plus fortes valeurs. On peut les considérées donc comme des souches très actives. La souche Fun 3 envahit la boîte de Pétri après 3 jours de culture. Cependant les souches Fun7 et Fun42 ont des indices relativement faibles (1 et 1,08 par ordre).

D'après le résultat de **figure 33**, on observe que toutes les souches sélectionnées sont capables de croître sur le milieu gélosé à 1% de tween 80 par l'apparition d'une zone précipitée, elles ont donc été capable de produire l'enzyme lipase dégradant la tween 80. La souche Fun 37 envahit la boîte de Pétri après 3 jours d'incubation. La zone de lyse est mesurée et le rapport de l'activité enzymatique est calculé (**Tableau 18**).

Tableau 18. Résultats de l'activité lipolytique des meilleures souches antagonistes

Code de souche	Diamètre de zone de lyse (mm)	Diamètre de colonie (mm)	Rapport
Fun3	27	25	1,08
Fun7	12	12	1
Fun13	28	25	1,12
Fun18	14	10	1,40
Fun29	33	29	1,14
Fun32	32	28	1,14
Fun36	36	31	1,16
Fun37	Envahissement	Envahissement	Envahissement
Fun42	18	15	1,20
Act11	15	10	1,5

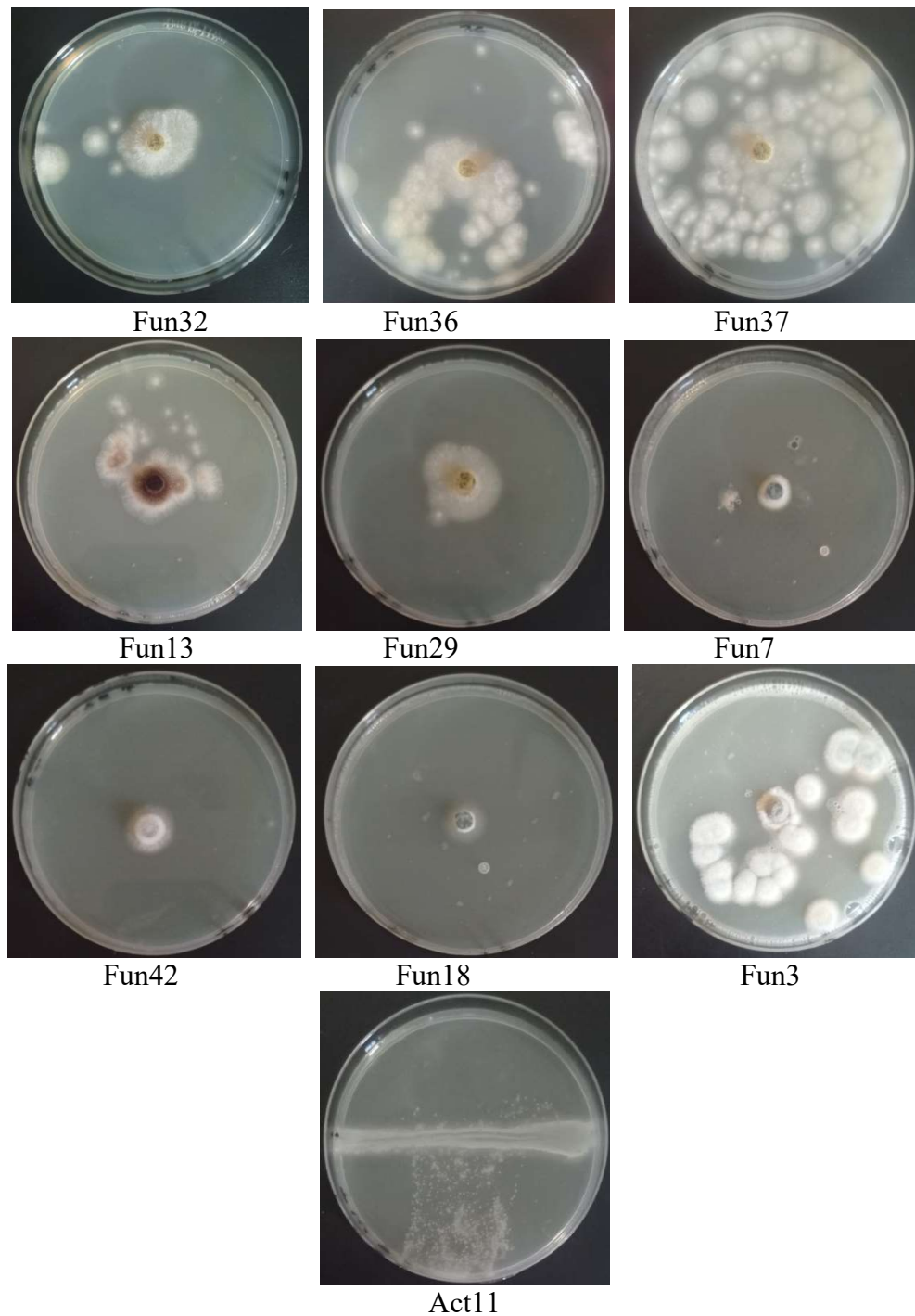


Figure 33. Résultats de l'activité lipolytique des meilleures souches antagonistes

D'après le **tableau 18**, en comparant les indices de l'activité enzymatique, on peut conclure que les souches Fun37 et Act11 avaient les plus fortes activités lipolytiques avec une croissance envahissante par Fun37 et un indice de 1,5 pour la souche Act11. Cependant la souche Fun7 a manifestée l'indice lipolytique le plus faible qui est égal à 1.

La lipase (EC 3.1.1.3) catalyse l'hydrolyse des triacylglycérols pour libérer du diacylglycéride, du monoacylglycérol, des acides gras à longue chaîne (>10 atomes de carbones) et du glycérol (Wang *et al.*, 2018). Cependant les estérases (EC 3.1.1.1) catalysent

principalement l'hydrolyse des liaisons ester des triglycérides à chaîne courte (<10 atomes de carbone) (Liu *et al.*, 2013).

Les espèces de *Penicillium* sont connues pour la production de lipase et estérase dans différentes conditions culturales à savoir : *P. cordubense*, *P. restrictum*, *P. raistrickii*, *P. polonicum*, *P. commune*, *P. jensenii*, et *P. aurantiovirens* (Pandey *et al.*, 2016). Similairement, les espèces *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus Terreus* sont aussi utilisés pour la production de ces enzymes avec grande quantité (Kumar et Ray, 2014). De leur côté, les actinomycètes en particulier les espèces *Streptomyces exfoliates*, *Nocardiosis alba*, *Microbacterium* spp. sont des producteurs importants de lipase et estérase (Hazarika et Thakur, 2020).

Des études suggèrent l'implication des lipides et de leurs métabolites dans les réponses de défense des plantes contre les agents pathogènes, lorsque des agents pathogènes atteignent les tissus végétaux, le premier défi qu'ils rencontrent est la cuticule lipophile recouvrant la surface des feuilles. Les phytopathogènes sécrètent généralement des lipases et des estérases dégradant la cuticule et, simultanément, les plantes et les agents antagonistes libèrent des composés acides gras/lipides agissant comme des agents antimicrobiens ou des molécules de signalisation qui transmettent des informations sur les changements extérieurs aux cellules hôtes. De plus, certains types d'acides gras préexistants dans les graines ou les feuilles contribuent à la résistance aux maladies (Lee et Park, 2019).

Lorsque les cellules végétales entrent en contact avec des microbes, des informations moléculaires entre l'hôte et l'envahisseur microbien sont échangées. Les cires cuticulaires établissent une barrière physique sur les surfaces des cellules épidermiques, modulent la communication entre l'hôte et le microbe, affectent le développement des agents pathogènes, servent de molécules de signalisation ou fournissent des éliciteurs pour la reconnaissance de l'attaque des agents pathogènes. Les éliciteurs sont des composés inducteurs de signaux reconnus par le système immunitaire inné, entraînant une induction de réponse de défense.

Les espèces d'*Aspergillus* produisent un ensemble d'oxylipines apparentées aux oxylipines végétales. Celles-ci jouent un rôle important dans la communication entre la plante et *Aspergillus* (Siebers *et al.*, 2016).

4.3.6. Activité chitinolytique

Les souches sélectionnées ont été examinées pour la production de l'enzyme chitinase extracellulaire en observant leurs croissances radiales et le changement de couleur de milieu de culture à base de chitine tel qu'il est représenté dans la **figure 34**.

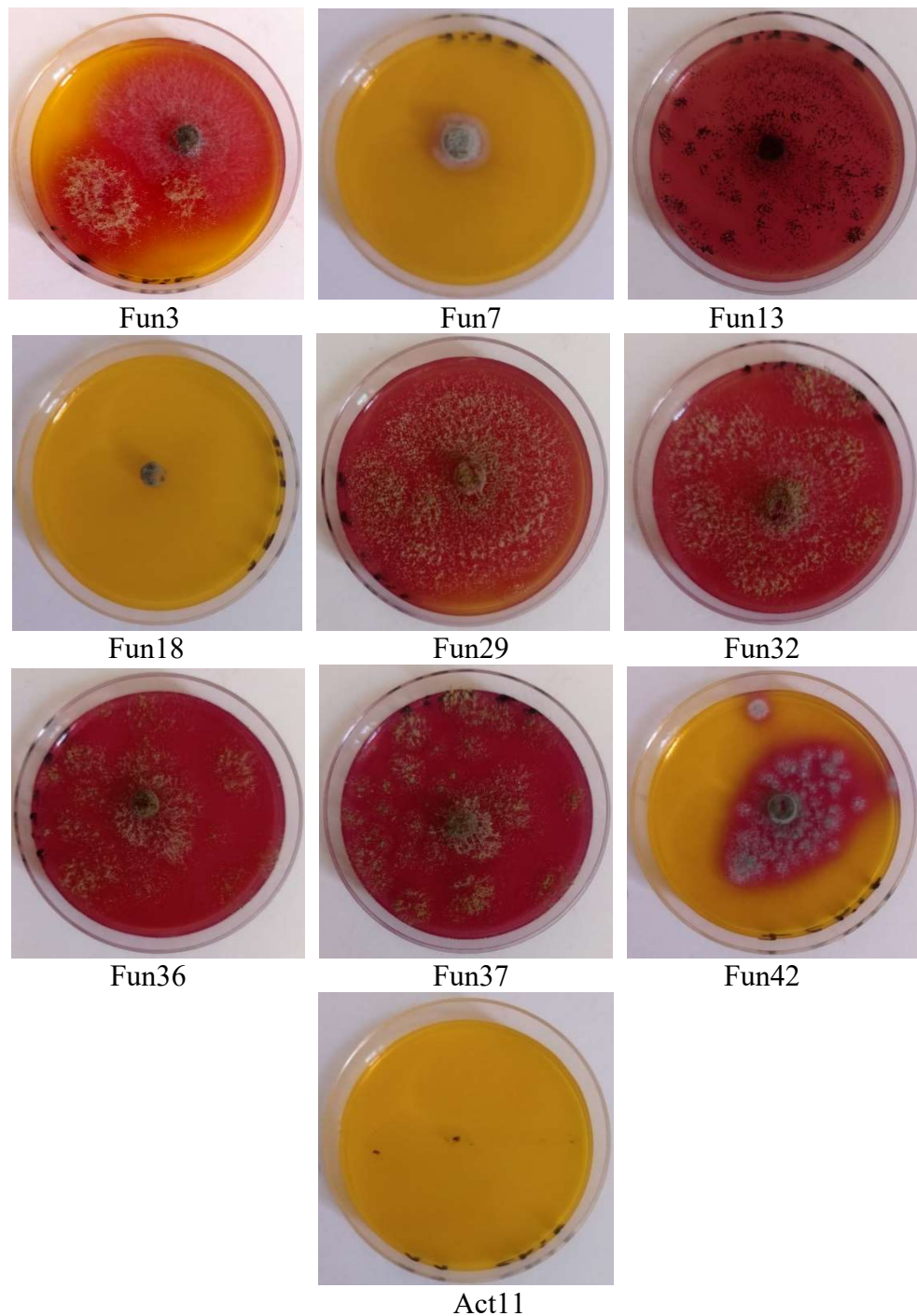


Figure 34. Résultats de l'activité enzymatique chitinolytique des meilleures souches antagonistes

Les résultats montrent que seules les souches Fun3, Fun13, fun29, fun32, Fun36, Fun37 et Fun42 sont capables de produire l'enzyme chitinase. La capacité de produire cette enzyme varie selon la nature de la souche. L'activité chitinolytique se traduit par le développement de mycélium fongique et le virage du couleur de milieu de culture de jaune vers le rouge à cause de la présence du l'indicateur de pH. Cependant les souches Fun7, Fun18 et Act11 donnent

des résultats négatives, où aucune croissance microbienne, ni de changement de couleur n'est observé sur le milieu.

Une réaction positive manifestée par un changement de couleur est interprétée par une alcalinisation du milieu suite à l'hydrolyse de la chitine en N-acetyl-glucosamine. Le changement de couleur est dû à la présence de l'indicateur de pH le violet de bromocrésol qui vire du jaune vers le rouge (**Lunge et Patil, 2012 ; Agrawal et Kotasthane, 2012**).

Selon **Agrawal et Kotasthane, (2012)** l'activité chitinolytique est classée en quatre catégories : (A) pas d'activité chitinase ; (B) activité chitinase faible ; (C) activité chitinase moyenne et (D) activité chitinase élevée. D'après nos résultats, nos souches sont classées comme étant non productrices de chitinase, c'est le cas de Fun7, Fun18 et Act11 ; ayant une activité chitinase moyenne, cas des souches Fun3 et Fun42 ; et ayant une forte activité Fun13, Fun29, Fun32, Fun36 et Fun37 (Figure 34).

La chitine est un composant majeur de la paroi cellulaire des champignons (**Hamid et al., 2013**). Les chitinases ont fait l'objet d'une attention particulière pour leur large gamme d'applications qui comprend leur utilisation dans la formation de protoplasmes à partir de champignons, comme agent potentiel de lutte biologique contre les champignons phytopathogènes et dans la production d'oligosaccharides en tant que substances biologiquement actives (**Nagpure et al., 2014**). Les enzymes chitinolytiques sont capables de lyser la paroi cellulaire de nombreux champignons phytopathogènes. Les microorganismes qui produisent ces enzymes sont capables d'éradiquer les maladies fongiques qui sont un problème pour la production agricole mondiale (**Brzezinska et Jankiewicz, 2012**).

Dans cette étude, les souches chitinolytiques les plus performantes ont été identifiées comme appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Des résultats similaires aux nôtres ont été trouvées par plusieurs chercheurs. A titre d'exemple, **Poria et al., (2021)** rapportent que des chitinases fongiques ont été signalées dans divers genres, tels que *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Beauveria*, *Coprinopsis*, *Mucor*, *Metarhizium*, *Pistacia* et *Lactarius*, etc. De plus, **Alves et al., (2018)** ont caractérisés la chitinase sécrétée par *A. niveus* et ont trouvé des caractéristiques très intéressantes pour d'éventuelles applications industrielles tels que l'activité à haute température et la thermostabilité, outre la possibilité de maintenir son activité en présence de différents composés, y compris la dénaturation et la réduction des agents pathogènes. *Penicillium oxalicum* k10 isolée du sol a révélé une capacité importante d'hydrolyser la chitine et une activité antifongique contre *Sclerotinia sclerotiorum*

avec une activité maximale vis-à-vis de la chitine colloïdale à pH 5 et à 40°C (Xie *et al.*, 2021). Nayak *et al.*, (2021) montrent que le sol contenant les déchets de carapaces de crevettes possède une activité chitinase plus élevée que le sol normal. Deux souches de *Penicillium chrysogenum* isolées de ces deux sols capables de produire de la chitinase de 3 809 U/g et 2 516 U/g *in vitro*, respectivement.

4.3.7. Activité laccase

Le résultat du criblage du potentiel laccase des souches antagonistes sur le milieu PDA additionné de DMP (2-6 diméthoxyphénol) est basé sur la formation de couleur jaune et marron claire dans le milieu signifiant que le champignon isolé produit l'enzyme laccase (Figure 35).

D'après les résultats présentés dans la figure 35 ci-dessus, on remarque que toutes les souches sélectionnées sauf les souches Fun13 et Act11 sont capables de produire l'enzyme laccase, cela se traduit par la croissance microbienne et le changement remarquable du milieu de culture vers le marron ou le jaune.

Les laccases sont des enzymes de type oxydase appelées benzènediol : oxydoréductases, EC 1.10.3.2 selon le nom systématique. Cette enzyme possède une spécificité plus large envers les substrats et peut hydrolyser une large gamme de composés organiques et inorganiques, y compris les groupes phénoliques, les groupes non phénoliques, l'hydroxyle et l'amine aromatique avec la réduction de l'oxygène moléculaire en eau avec le mécanisme d'oxydation. Les laccases catalysent des réactions de transfert d'un électron à partir de substrats phénoliques avec la réduction simultanée d'O₂ en eau (Senthivelan *et al.*, 2019).

La laccase peut être isolée à partir de plantes, d'insectes et de microorganismes. Les laccases microbiennes sont impliquées dans la sporulation, la production de pigments, la formation de fructifications, la défense contre le stress, la pathogénèse des plantes et la dégradation de la lignine (Arregui *et al.*, 2019).

Des études ont montré que plusieurs champignons filamenteux sont capables de produire les enzymes laccases. Kumar *et al.*, (2016) décrivent l'isolement d'une souche fongique productrice de laccase et l'optimisation des paramètres pour atteindre la production maximale de laccases extracellulaires par *Aspergillus flavus*. Iqbal *et al.*, (2018) décrivent aussi une nouvelle laccase obtenue à partir d'*Aspergillus niger* qui a été utilisée comme catalyseur vert à des fins de greffage. Autre nouvelle laccase fongique a été produite à partir d'*Aspergillus terreus* –S19 isolé du sol d'une scierie qui a montré une excellente activité à pH 5,0 et à une température de 30°C (Shaikh *et al.*, 2020). El-Shora *et al.*, (2008) indiquent que *Penicillium*

aculeatum, *P. digitatum* et *P. cyclopium* ont exprimé des activités appréciables de la laccase. Autre nouvelle souche fongique *Penicillium chrysogenum* a été isolée de l'arbre par une technique de culture tissulaire et s'est révélée capable de produire la laccase (Senthivelan *et al.*, 2019).

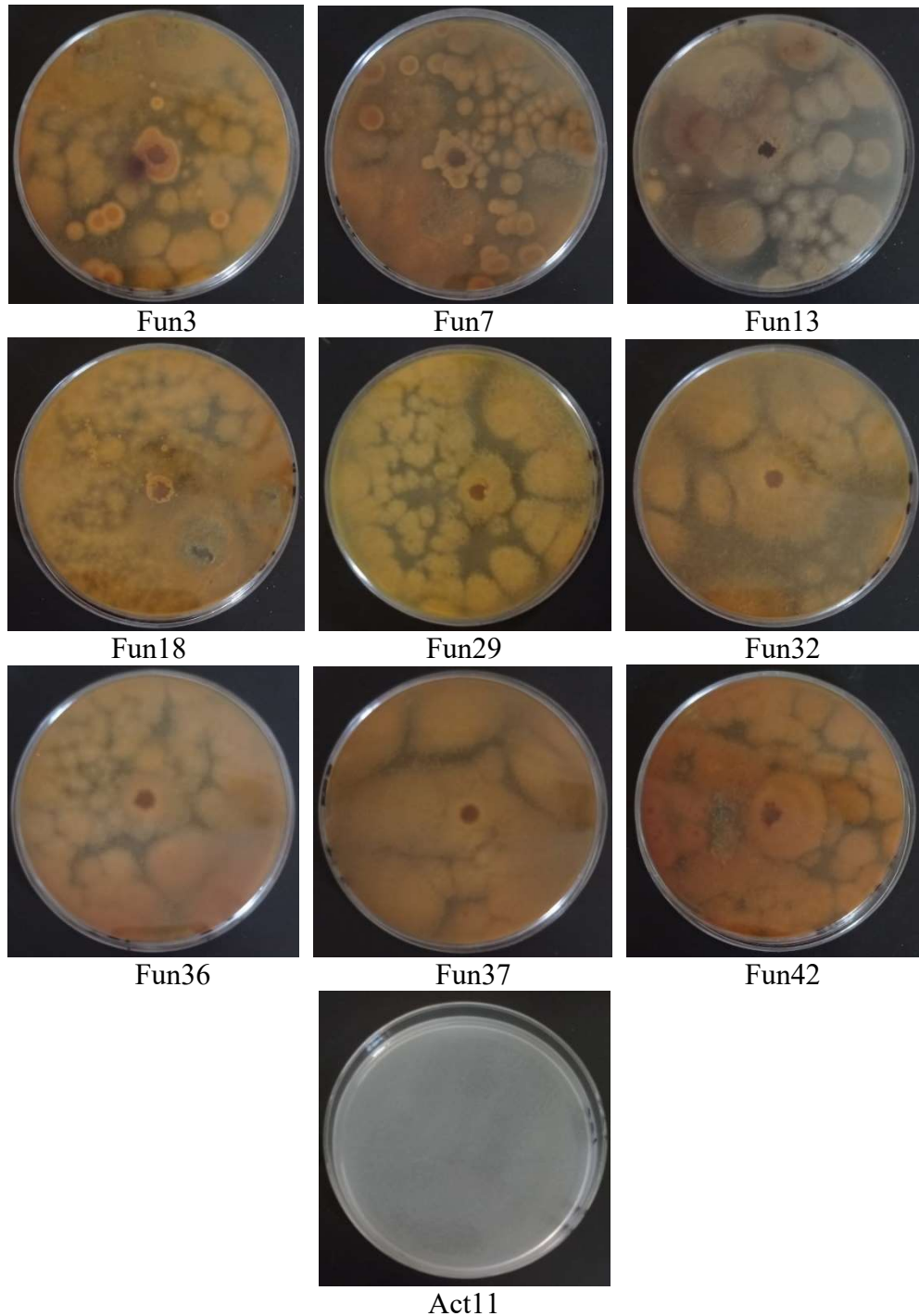


Figure 35. Résultat de test de l'activité enzymatique laccase des meilleures souches antagonistes.

5. Détermination *in vitro* de l'activité inhibitrice des molécules bioactives secrétées par les souches antagonistes

La production des métabolites secondaires nécessite un milieu de fermentation et des paramètres de fermentation bien contrôlés pour améliorer la capacité de contrôle biologique des antagonistes. Ces métabolites secondaires pourraient être diffusés dans le milieu et inhiber la croissance de microbes pathogènes sélectionnés. Sur la base des résultats de l'activité inhibitrice de croissance par le test de la confrontation directe, dix souches ont été sélectionnées pour la fermentation.

La production de molécules bioactives à partir des dix souches antagonistes a été effectuée par une fermentation sur milieu liquide (PDB pour les moisissures et ISP2 pour les actinomycètes). La mise en évidence de l'activité antifongique de ces molécules a été réalisée en testant le filtrat de fermentation ajouté au PDA avec des concentrations différentes 10%, 20% et 40% (v/v) en présence de l'agent phytopathogène *Alternaria* sp. Les résultats obtenus à partir de ce test sont regroupés dans le **tableau 19**.

Tableau 19. Résultats de l'effet des filtrats de fermentation des souches antagonistes sur la croissance des souches phytopathogènes par différentes concentrations.

Isolat	Concentration de filtrat	Pourcentage d'inhibition de Tom1 (%)	Pourcentage d'inhibition de Tom2 (%)	Pourcentage d'inhibition de Tom3 (%)
Fun3	10%	37,04	58,82	63,27
	20%	64,81	66,67	65,31
	40%	68,52	80,39	87,76
Fun7	10%	3,70	19,61	18,37
	20%	44,44	50,98	40,82
	40%	59,26	56,86	55,10
Fun13	10%	5,55	7,84	10,20
	20%	42,59	41,18	40,82
	40%	50	52,94	40,82
Fun18	10%	22,22	35,29	38,78
	20%	53,70	52,94	59,18
	40%	74,07	72,55	71,43
Fun29	10%	20,37	11,76	36,73
	20%	55,56	47,06	61,22
	40%	66,67	64,71	63,27
Fun32	10%	20,37	15,69	10,20
	20%	53,70	52,94	46,94
	40%	55,56	52,94	51,02
Fun36	10%	16,67	19,61	22,45
	20%	53,70	49,02	53,06

	40%	62,96	60,78	57,14
Fun37	10%	16,67	21,57	18,37
	20%	55,56	50,98	53,06
	40%	62,97	60,78	59,18
Fun42	10%	22,22	19,61	34,70
	20%	55,56	54,90	59,18
	40%	77,78	76,47	63,27
Act11	10%	18,52	15,69	18,37
	20%	55,56	50,98	51,02
	40%	55,56	56,86	55,10

La plus haute valeur d'inhibition

La plus faible valeur d'inhibition

Les souches phytopathogènes d'*Alternaria* Tom1, Tom2 et Tom3 ont été cultivées sur la gélose au dextrose de pomme de terre (PDA) avec un filtrat de culture des antagonistes sélectionnés, et du PDA plus un bouillon de dextrose de pomme de terre (PDB) a été utilisé comme témoin. Les filtrats des isolats sélectionnés ont été capables d'inhiber les souches phytopathogènes avec des taux d'inhibition différents allant de 3,70% à 87,76 % par rapport au contrôle. En plus, les filtrats de culture des dix antagonistes testés ont montré une efficacité préminente dans la suppression des champignons pathogènes lorsque leurs concentrations dans le milieu PDA est augmentée jusqu'à 40 % (v/v).

Pour la souche Tom1, le filtrat de l'antagoniste Fun18 avec une concentration de 40% était capable de provoquer une inhibition de 74,07%. Le filtrat de l'antagoniste Fun42 avec la même concentration inhibe la croissance de Tom1 d'une valeur de 77,78%. Cependant, les filtrats des souches Fun7 et Fun13 avec une concentration de 10% inhibent la croissance de Tom1 avec les plus faibles taux d'inhibitions (3,70% et 5,55% respectivement). L'analyse statistique indique qu'il y'a une différence significative entre la concentration 10% et 20% et entre 10% et 40% alors qu'il n'y'a pas une différence entre la concentration 20% et 40% ($p < 0.05$) (Tableau 20).

Tableau 20. L'analyse statistique de l'effet de concentration de filtrat sur la suppression de Tom1.

ANOVA						
	Somme des carrés	df	Carré moyen	F	Sig.	
Entre groupes	14151,094	2	7075,547	110,224	,000	
Au sein des groupes	2439,304	38	64,192			
Totale	16590,398	40				
Comparaison multiple						
Variable dépendante						
Tukey HSD						
(I) groupes	(J) groupes	Différence moyenne (I-J)	Std. Erreur	Sig.	95% Intervalle de confiance	
					Limite inférieure	Limite supérieure
10%	20%	-37,41429*	3,08594	,000	-44,9404	-29,8882
	40%	-42,01500*	3,08594	,000	-49,5411	-34,4889
20%	10%	37,41429*	3,08594	,000	29,8882	44,9404
	40%	-4,60071	3,02825	,293	-11,9861	2,7847
40%	10%	42,01500*	3,08594	,000	34,4889	49,5411
	20%	4,60071	3,02825	,293	-2,7847	11,9861

*. La différence moyenne est significative au seuil de 0,05.

Pour la souche Tom2, la souche Fun3 était capable de supprimer 80,39% de croissance du pathogène, cette souche a influencé forcément la croissance de Tom2 même avec un filtrat de concentration de 10%, elle inhibe 58,82% de la croissance de Tom2. Alors que le filtrat de souche Fun42 à une concentration de 40% supprime 76,47% de la croissance du Tom2. Les filtres des souches Fun13 et fun29 avec une concentration de 10% inhibent la croissance du Tom2 avec des taux d'inhibition très faibles (7,84% et 11,76%, respectivement). L'analyse statistique indique qu'il y a une différence significative entre les trois concentrations 10%, 20% et 40% lorsque $p < 0.05$ (**Tableau 21**).

Tableau 21. L'analyse statistique de l'effet de concentration de filtrat sur la suppression de Tom2.

ANOVA						
	Somme des carrés	df	Carré moyen	F	Sig.	
Entre groupes	10013,717	2	5006,858	35,204	,000	
Au sein des groupes	5546,683	39	142,223			
Totale	15560,400	41				

Comparaison multiple						
Variable dépendante						
Tukey HSD						
(I) groupes	(J) groupes	Différence moyenne (I-J)	Std. Erreur	Sig.	95% intervalle de confiance	
					Limite inférieure	Limite supérieure
10%	20%	-31,22857*	3,91316	,000	-40,7622	-21,6949
	40%	-42,29571*	3,91316	,000	-51,8294	-32,7621
20%	10%	31,22857*	3,91316	,000	21,6949	40,7622
	40%	-11,06714*	3,91316	,020	-20,6008	-1,5335
40%	10%	42,29571*	3,91316	,000	32,7621	51,8294
	20%	11,06714*	3,91316	,020	1,5335	20,6008

*. La différence moyenne est significative au seuil de 0,05.

Pour la souche Tom3, la souche Fun3 attaque forcément la souche Tom3 en supprimant sa croissance avec une concentration de filtrat de 40% et un taux d'inhibition de 87,76%. Fun3 est considérée comme la souche la plus performante dans l'inhibition de la croissance du phytopathogène. D'un autre côté, un pourcentage d'inhibition de 71,43% du croissance de Tom3 est exercé par le filtrat de la souche Fun18. Deux pourcentages d'inhibition égaux de 10,20% sont observés pour les filtrats des souches Fun13 et Fun32 avec une concentration de 10%. L'analyse statistique montre la présence d'une différence entre la concentration 10% et 20% et entre la concentration 10% et 40% et l'absence de différence entre la concentration 20% et 40% lorsque $p < 0.05$ (**Tableau 22**).

Tableau 22. L'analyse statistique de l'effet de concentration de filtrat sur la suppression de Tom3.

ANOVA						
	Somme des carrés	df	Carré moyen	F	Sig.	
Entre groupes	10013,717	2	5006,858	35,204	,000	
Au sein des groupes	5546,683	39	142,223			
Totale	15560,400	41				
Comparaison multiple						
Variable dépendante						
Tukey HSD						
(I) groupes	(J) groupes	Différence moyenne (I-J)	Std. Erreur	Sig.	95% Intervalle de confiance	
					Limite inférieure	Limite supérieure
10%	20%	-27,89929*	4,50750	,000	-38,8809	-16,9176
	40%	-36,06571*	4,50750	,000	-47,0474	-25,0841
20%	10%	27,89929*	4,50750	,000	16,9176	38,8809
	40%	-8,16643	4,50750	,179	-19,1481	2,8152
40%	10%	36,06571*	4,50750	,000	25,0841	47,0474
	20%	8,16643	4,50750	,179	-2,8152	19,1481

*. La différence moyenne est significative au seuil de 0,05.

Nos résultats montrent que le filtrat de culture de Fun3 inhibe fortement la germination des spores des champignons pathogènes Tom2 et Tom3 (**Figures 36 et 37**). Ces résultats indiquent que le filtrat de Fun3 rajouté au PDB pourrait libérer des métabolites diffusibles extracellulaires qui inhibent la germination des spores des agents pathogènes d'*Alternaria*.

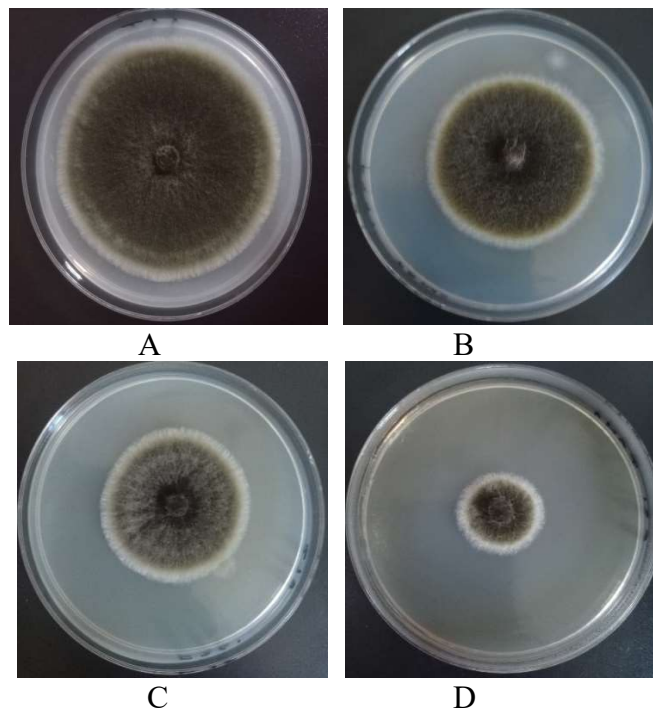


Figure 36. Effet du filtrat de l'antagoniste Fun3 contre le phytopathogène Tom2 (A : sans filtrat, B : avec 10% de filtrat, C : avec 20% de filtrat, D : avec 40% de filtrat).

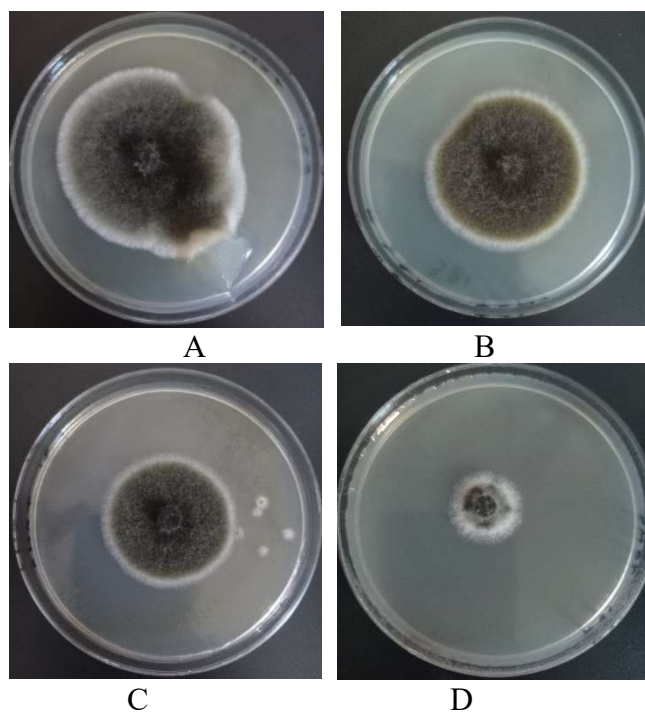


Figure 37. Effet du filtrat de l'antagoniste Fun3 contre le phytopathogène Tom3 (A : sans filtrat, B : avec 10% de filtrat, C : avec 20% de filtrat, D : Avec 40% de filtrat).

D'un autre côté, le filtrat de la souche Fun18 appliqué à une concentration de 40% a également montré une activité inhibitrice importante contre la souche Tom1 (74,07%) et contre la souche Tom3 (71,43%) (Tableau 19, Figures 38, 39).

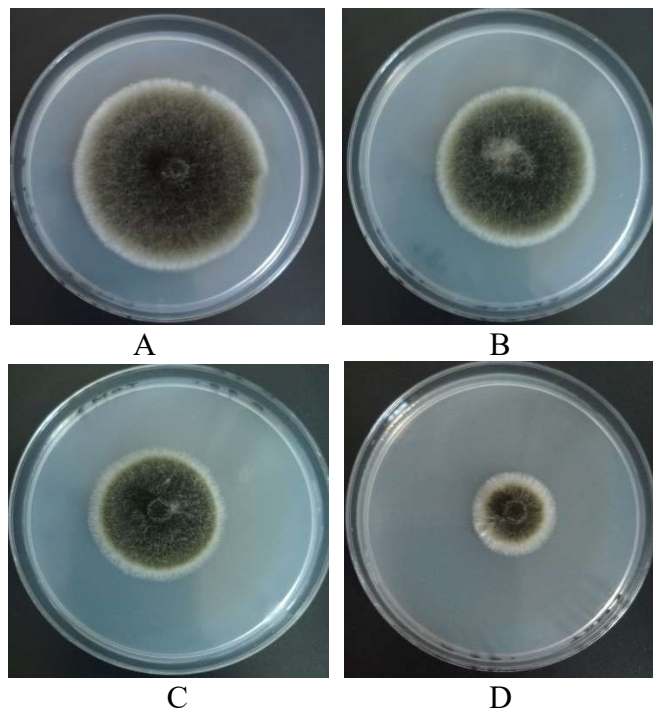


Figure 38. Effet du filtrat de l'antagoniste Fun18 contre le phytopathogène Tom1 (A : sans filtrat, B : avec 10% de filtrat, C : avec 20% de filtrat, D : avec 40% de filtrat).

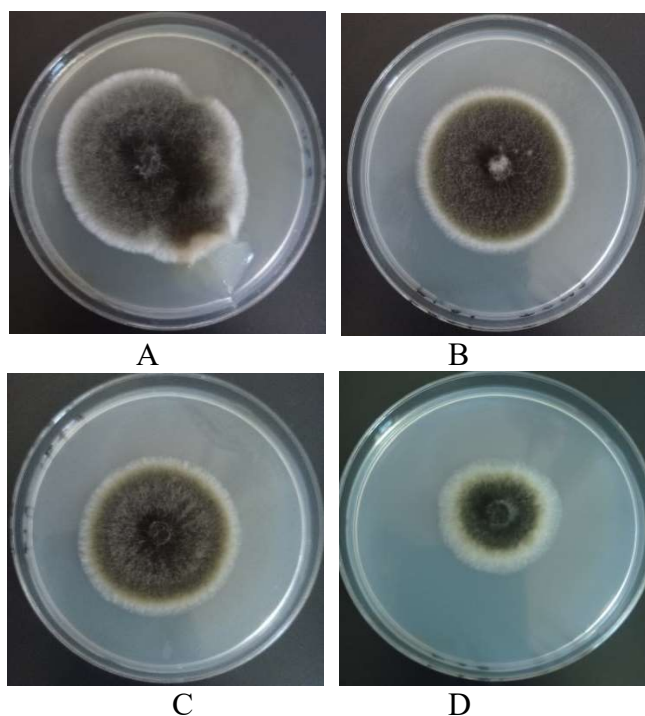


Figure 39. Effet du filtrat de l'antagoniste Fun18 contre le phytopathogène Tom3 (A : sans filtrat, B : avec 10% de filtrat, C : avec 20% de filtrat, D : avec 40% de filtrat).

En plus, le filtrat de souche Fun42 avec une concentration de 40% supprime le phytopathogène Tom1 et Tom2 avec des pourcentages de 77,78% et 76,47% respectivement (Tableau 19, Figures 40, 41).

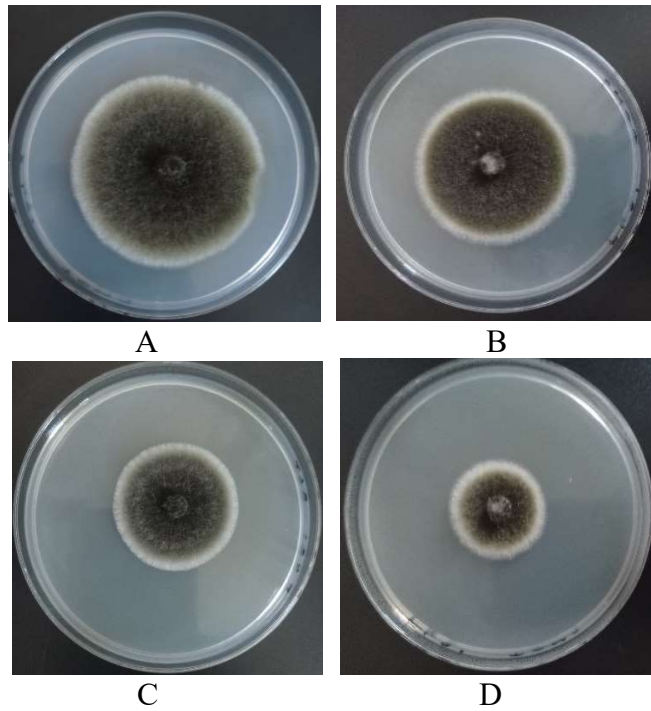


Figure 40. Effet du filtrat de l'antagoniste Fun42 contre le phytopathogène Tom1 (A : sans filtrat, B : avec 10% de filtrat, C : avec 20% de filtrat, D : avec 40% de filtrat).

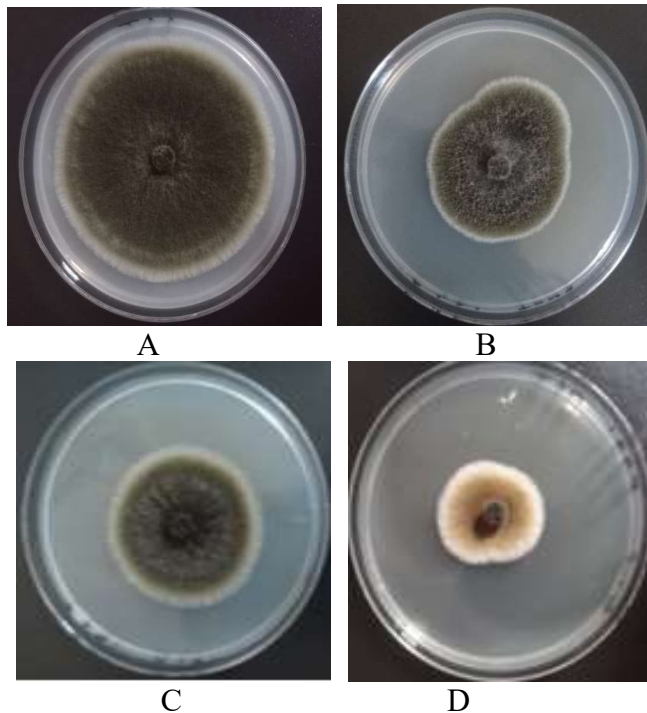


Figure 41. Effet du filtrat de l'antagoniste Fun42 contre le phytopathogène Tom2 (A : sans filtrat, B : avec 10% de filtrat, C : avec 20% de filtrat, D : avec 40% de filtrat).

Cependant le filtrat de la souche Fun7 avec une concentration de 10% exerce une faible activité inhibitrice contre la souche Tom1. Similairement, la souche Fun13 a montré une très faible activité inhibitrice par rapport aux autres souches, où même avec un filtrat de 40%, une

faible inhibition de croissance des phytopathogènes Tom1, Tom2 et Tom3 a été notée (50%, 52.94% et 40.82% respectivement) (**Figure 42, Tableau 19**).

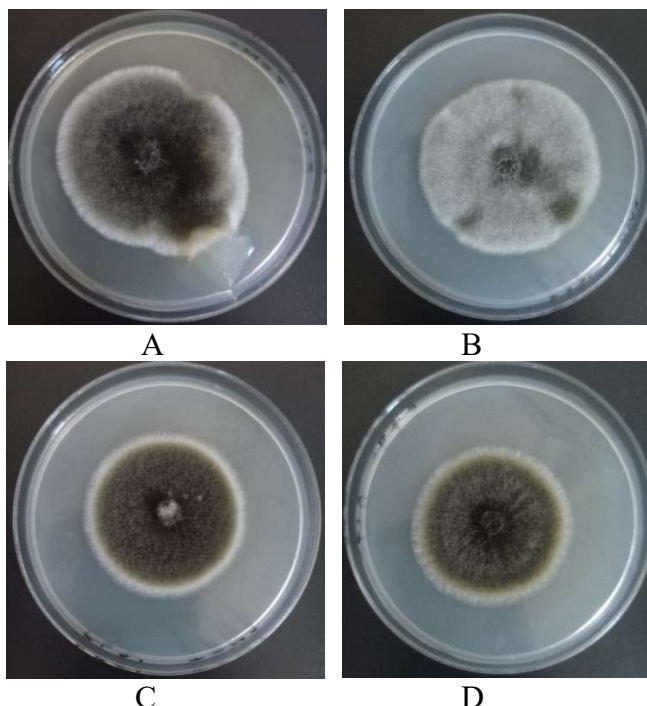


Figure 42. Effet du filtrat de l'antagoniste Fun13 contre le phytopathogène Tom3 (A : sans filtrat, B : avec 10% de filtrat, C : avec 20% de filtrat, D : avec 40% de filtrat).

En comparant les résultats obtenus à partir de ce test avec les résultats de confrontation directe, il a été remarqué que les souches Fun3, Fun18 et Fun42 exercent une forte activité inhibitrice d'une manière directe ou indirecte. Cela signifie que ces souches exercent leur activité inhibitrice soit par un contact direct avec le phytopathogène ou par la sécrétion des métabolites secondaires extracellulaires qui agissent en diminuant fortement le développement des souches phytopathogènes. Ces souches possèdent probablement un mécanisme d'antagonisme basé sur la sécrétion de métabolites secondaires à effet inhibiteur, dont la production était améliorée par les conditions de la fermentation, mais moins importante dans un milieu solide (test de confrontation sur gélose). La deuxième catégorie comprend la souche Act 11 qui donne un effet égal dans les deux tests (test de confrontation directe et test de filtrat). La troisième catégorie décelée regroupe les souches qui ont plutôt montré un bon effet inhibiteur dans le test de confrontation, c'est le cas des souches Fun7, Fun13, Fun29, Fun32, Fun36 et Fun37. Cette différence d'effet peut être expliquée par un mode d'antagonisme nécessitant un contact direct entre les deux mycéliums antagoniste et pathogène, c'est le mode du parasitisme. Un autre mode plausible dans ce cas est la

compétition par sécrétion d'enzymes ou de molécules chélateurs de minéraux favorisant la croissance de l'antagonisme au profil du pathogène.

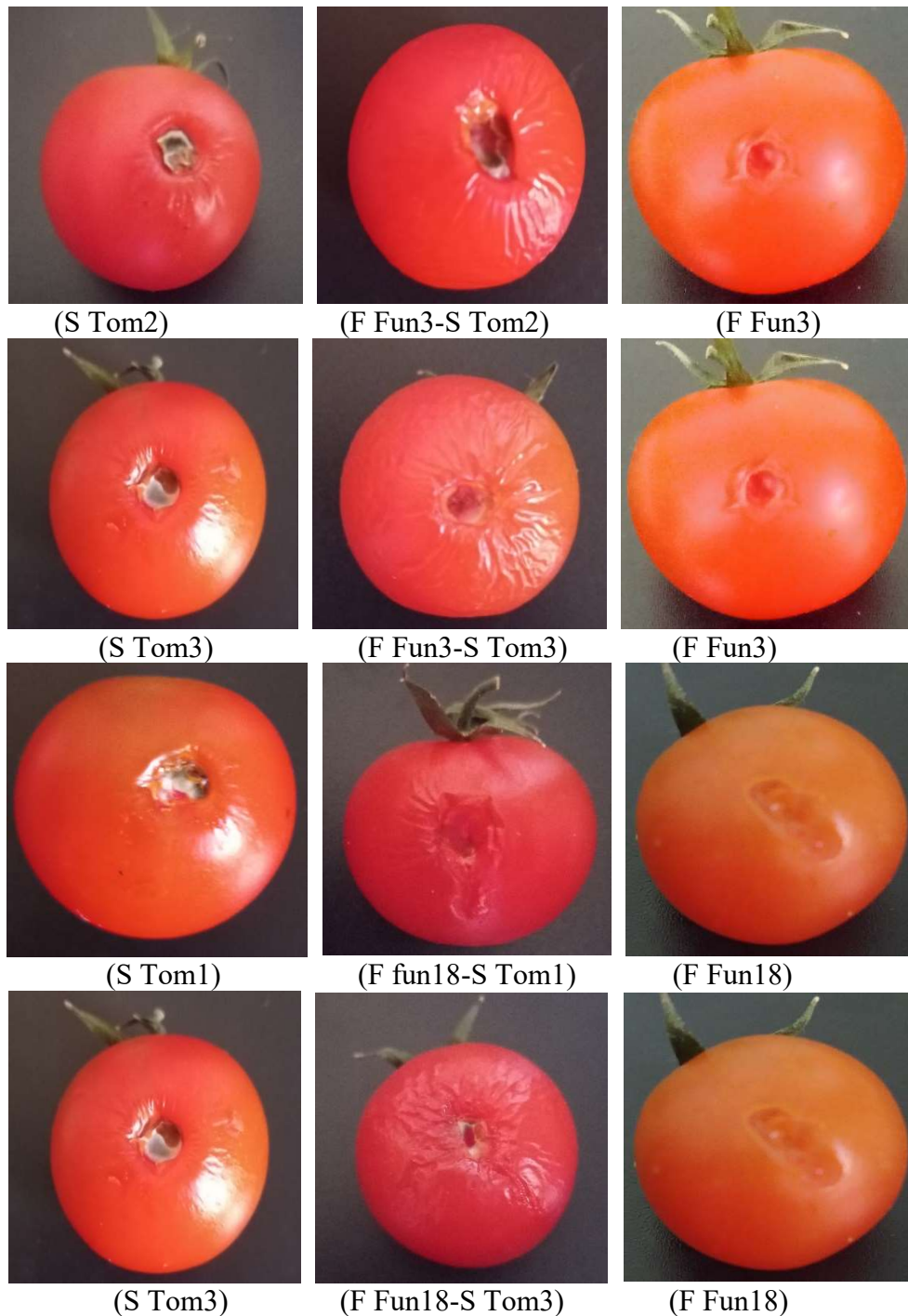
Dans notre étude, nous avons trouvé que les souches appartenant aux genres de *Penicillium* et *Aspergillus* exercent un effet antagoniste remarquable pour lutter contre le genre phytopathogène de la tomate *Alternaria*. Dans le même sens, **Sreevidya et Gopalakrishnan, (2016)** ont constaté que le diamètre de la colonie de *Fusarium solani* a été significativement diminué avec la présence de *Penicillium spp.* à un pourcentage d'inhibition de 75%. **Dwivedi, (2013)** a confirmé la toxicité fongique de quatre espèces d'*Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. sulphureus Desm.* et *A. luchuensis Inui*), et de deux espèces de *Penicillium* (*P. citrinum Thom* et *P. italicum*) contre le phytopathogène *Alternaria alternata*. **Sreevidya et Gopalakrishnan, (2016)** ont montré l'efficacité d'*Aspergillus* et ses métabolites contre le phytopathogène *Botrytis cinerea*, l'agent causal de la maladie grise des plantes. Dans une autre étude, **Thakur et Harsh, (2014)** ont noté que *A. niger* et *P. sublateritium* ont présenter une efficacité antagoniste importante dans l'inhibition de la croissance mycélienne d'*A. alternata* par la production de métabolites extracellulaires. **Sempere et Santamarina, (2010)** ont rapporté que la dégradation et la pénétration des parois cellulaires d'*A. alternata* est causée par *P. oxalicum* qui produit des composants antifongiques et métabolites extracellulaires comme les enzymes dégradant la paroi telle que les chitinases, glucanases et protéases.

Ma et al., (2008) ont étudié le potentiel de *Penicillium striatisporum* comme agent de lutte biologique contre les maladies causées par des agents pathogènes des plantes tels que *Phytophthora spp.*, *Cladosporium cucumerium*, et *Sclerotinia sclerotiorum*. Ces auteurs ont suggéré que la suppression de ces agents pathogènes peut être due à la production des enzymes dégradant la paroi en premier temps et des métabolites toxiques antimicrobiennes secrétés par l'agent de la lutte biologique.

Partie 2. Criblage in planta de l'activité antifongique des souches antagonistes contre le phytopathogène *Alternaria sp.*

Dans cette partie de notre étude, l'activité antifongique des souches candidats contre les isolats phytopathogène d'*Alternaria* a été mise en évidence *in planta* sur des fruits de tomate sains. Les souches Fun3, Fun18 et Fun42 ont choisi sur la base des résultats des tests précédant qui ont montré leur performance dans l'inhibition des pathogènes. Les filtrats des

souches actives étaient injectés dans les fruits de tomate avant l'inoculation fongique dans l'objectif d'un effet protecteur. Les tomates inoculées par la solution sporale d'*Alternaria* et non traités (contrôle) ont manifesté des symptômes de brûlure une semaine après l'inoculation. Ces symptômes ont évolué vers une nécrose. Cependant, les plantes inoculées et traitées avec le filtrat des souches Fun3, Fun18 et Fun42 étaient similaires aux fruits témoins saines, c'est-à-dire n'ont manifestés aucun symptôme d'infection fongique. Ces résultats indiquent que le traitement des tomates avec le filtrat des souches antagonistes actives est efficace pour prévenir l'apparition des symptômes (**Figure 43**).



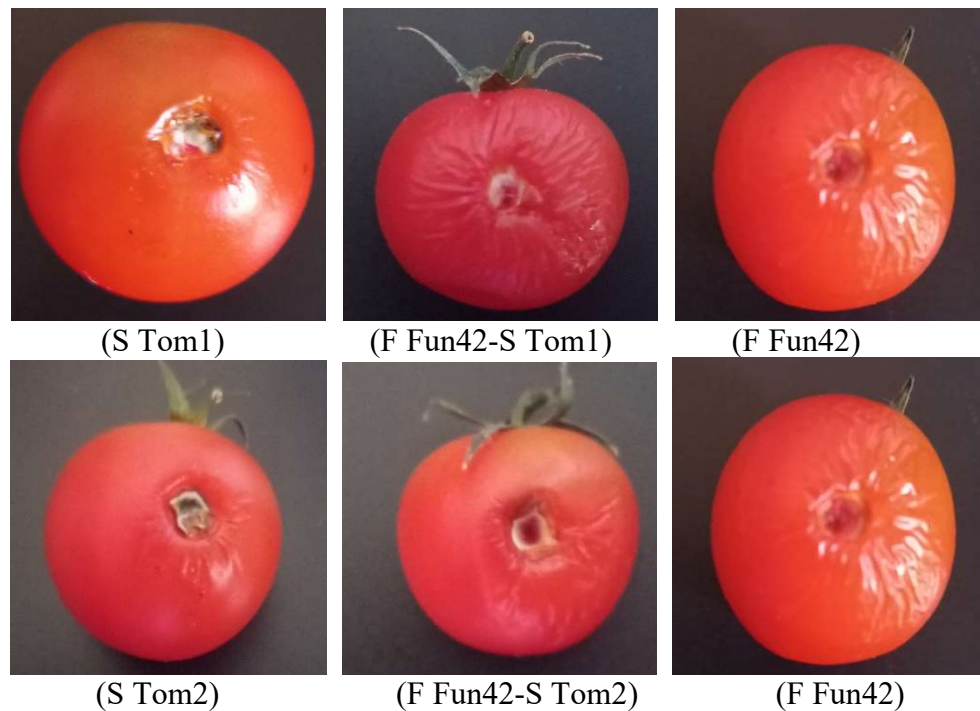


Figure 43. Résultats de l'effet *in planta* des filtrats des antagonistes sur les tomates infectées par *Alternaria* (S : solution sporale, F : filtrat, Fun : antagoniste fongique, Tom : phytopathogène).

Suite à leur inoculation par les solutions sporales des souches phytopathogènes Tom1, Tom2 et Tom3, les fruits de tomates ont manifestées des lésions bien caractéristiques du genre *Alternaria* au niveau des spots d'inoculation (**Figure 43**). Contrairement à ça, les observations faites sur une période de 4 jours après l'expérience ont montré que l'application préalable des filtrats des antagonistes a entraîné soit une diminution remarquable du développement des souches d'*Alternaria* par rapport au témoin non protégé, c'est le cas des couples Fun18-Tom3, Fun42- Tom1 et Fun42-Tom2, ou une absence totale du développement du pathogène, c'est le cas des couples Fun42-Tom1 et Fun3-Tom3 (**Figure 43**).

Tableau 23. Résultats de l'activité antifongique des filtrats des antagonistes *in planta*.

Filtrat des antagonistes actives	Efficacité de biocontrôle (%)		
	Tom1	Tom2	Tom3
Fun3	/	70	100
Fun18	100	/	75
Fun42	55,56	80	/

(/) : n'est pas testé.

Le diamètre de la lésion mesuré sur les fruits de tomate traités par le filtrat de culture de Fun3 était inférieur à celle des fruits qui ont été inoculées par la solution sporale de phytopathogène seule (**Figure 43**). Cela suggère que le filtrat de cette souche a

significativement réduit les lésions causées par *Alternaria* sur les fruits. De plus l'efficacité de la lutte biologique s'est avérée être de 70 % pour Tom2 et 100 % pour Tom3 lorsque les plantes ont été traitées le filtrat de Fun3 (**Tableau 23**).

D'un autre côté, le filtrat de la souche Fun18 a réduit les symptômes de la maladie avec un pourcentage de 100% pour Tom1 et 75% pour Tom3 (**Tableau 23**). Il a réduit le diamètre de lésion d'une manière significative (**Figure 43**). Le filtrat de Fun 42 donne une efficacité de 55,56% pour lutter contre Tom1 et 80% pour Tom2. En présence de filtrat Fun3 et Fun 18 les tomates sont totalement protégées contre Tom3 et Tom1, respectivement.

Les souches Fun3, Fun18 et Fun42 issues des sols agricoles inhibent la croissance des souches *Alternaria* sp. *in vitro*, mais également *in planta*. Les expériences d'**Arfaoui et al., (2006)** ont indiqué que les résultats *in vitro* sont différents de celle *in planta*. Nos résultats sont en accord avec l'idée que les microorganismes antagonistes efficaces *in planta* ne sont pas nécessairement les plus efficace *in vitro* et vice versa, ce qui reflété par les valeurs d'inhibition différents entre les deux tests. L'activité anti-*Alternaria* étudiée dans le présent travail peut être expliquée par le pouvoir de ces souches performantes à produire des substances antifongiques. Cela est reflété par la capacité des filtrats des antagonistes à réduire ou a inhiber le développement de l'agent phytopathogène de manière directe ou indirecte aussi *in vitro* que *in planta*. De nombreux chercheurs ont sélectionné des antagonistes en combinant des méthodes *in vitro* et *in planta*. Les essaies *in vitro* sont plus pratiques et rapides pour examiner l'effet inhibiteur des souches. Cependant, les conditions *in vitro* ne peuvent pas produire le même effet inhibiteur que les conditions expérimentales *in planta* (**Wang et al., 2008 ; Shi et Sun, 2017**). Dans cette étude, la méthode de criblage *in planta* a été utilisée en se basant sur de résultats de ciblage *in vitro* afin d'éviter les incohérences entre *in vitro* et *in planta*.

De nombreux études ont montré que les mécanismes de lutte biologique pour protéger et améliorer la résistance des plantes contre les maladies varient selon la souche antagoniste. Certaines souches agissent individuellement, d'autres par contre donnent un meilleur effet en consortium avec d'autres souches et d'autres en symbiose avec la plante hôte. Lorsqu'elles sont utilisées sur le terrain, les souches antagonistes sont souvent affectées par des facteurs externes tels que l'humidité du sol, la température, pH, l'état de croissance des cultures et d'autres microorganismes dans la plante. L'extrapolation des résultats d'expériences faites en laboratoire sur champ, est donc un processus compliqué d'extrapoler (**Dong et al., 2021**). Étant donné que le mécanisme d'antagonisme est un processus compliqué qui est géré et affecté par de nombreux facteurs directes et indirectes, des études supplémentaires faites sur

terrain seront nécessaires pour mieux comprendre l'effet de nos souches comme possibles agents de lutte biologique.

Partie 3 : Criblage *in silico* du potentiel de biocontrôle de métabolites secondaires fongiques et actinomycétales

1. Modélisation homologue des cibles enzymatiques

1.1. Identification et sélection des templates (matrices) des enzymes cibles

Dans la première étape du processus de la modélisation, les templates des enzymes étudiées (cystathionine béta lyase, homoserine O-acétyltransférase, glutathione réductase, pecate lyase, scytalone déhydratase, thioredoxin peroxidase, thioredoxin réductase, 3HNR (1,3,8-trihydroxynaphthalene reductase) et 4HNR (1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene reductase) ont été recherchées par l'interrogation de la base de données de recherche de similarité BLAST contre la base de donnée PDB, en introduisant les séquences protéiques des enzymes étudiées.

Après avoir obtenu une liste de templates potentiels, nous avons sélectionné les top quatre entrés les plus apparentées des protéines cibles. Le choix des templates potentiels a été basé sur les points suivants :

- Un pourcentage d'identité élevée.
- Une faible valeur d'E.value.
- Un pourcentage élevé de couverture de la séquence requête.

À mesure que la similarité globale de la séquence template avec la séquence cible augmente, la qualité de la matrice augmente également. La règle la plus simple pour la sélection du template consiste à sélectionner la structure qui présente la plus grande similarité de séquence avec la séquence modélisée.

Toutes les protéines templates sélectionnées ont un pourcentage d'identité supérieure à 30% (**Tableau 24**) ce qui signifie que ces données sont des bons résultats, cette remarque est confirmée par **Xiang, (2006)** qui rapporte que si la séquence requête a une identité de séquence élevée (> 30%) avec une séquence donnée, la détection d'homologie est assez solide, mais lorsque l'identité de séquence est inférieure à 30 %, les résultats d'homologie de BLAST ne sont pas fiables. De même, **Adebiyi et Olugbara (2021)** montrent qu'une identité de séquence de 30 % ou plus a été considérée comme un résultat important dans le processus de la recherche de similarité. La valeur attendue (E) est un paramètre qui signifie le nombre de résultats que l'on peut "s'attendre" à voir par hasard lors d'une recherche dans une base de données d'une taille particulière. Il réduit de façon exponentielle à mesure que le Score (S) du

match augmente. Principalement, la valeur E décrit le bruit de fond aléatoire. Par exemple, une valeur E de 1 attribuée à un hit peut être interprétée comme signifiant que dans une base de données de la taille actuelle, on pourrait s'attendre à voir 1 correspondance avec un score similaire simplement par hasard. Plus la valeur E est faible, ou plus elle est proche de zéro, plus la correspondance est "significative" (Boratyn *et al.*, 2012). Les séquences templates sélectionnées présentes toutes des valeurs E-values faibles et satisfaisants (Tableau24).

Tableau 24. Séquences templates choisies pour la modélisation des structures 3D des enzymes cibles d'*Alternaria* sp.

Enzymes	PDB ID du template	Longueur en aa	Identité (%)	Couverture de la cible (%)	E-value
Cystathionine β -lyase	1IBJ	464	50,55%	80%	6e-126
	7D7O	377	43,50%	78%	2e-99
	4L0O	388	42,58%	80%	1e-94
	7MD1	380	40,05%	80%	5e-93
Glutathionine reductase	2HQM	479	54,12%	99%	2e-168
	2GRT	463	50,11%	98%	3e-150
	1GRT	478	50,11%	98%	4e-150
	1XAN	461	50,54%	98%	4e-148
Pectate lyase	3B90	226	35,08%	72%	8e-25
	4U49	347	35,11%	71%	1e-24
	3B4N	344	35,08%	72%	2e-24
	1EE6	197	44,55%	41%	9e-21
Homoserine O-acetyltransferase	2VAT	444	50,19%	79%	1e-72
	2VAV	444	49,03%	79%	4e-72
	2PL5	366	36,97%	67%	1e-43
	5W8P	370	37,02%	66%	3e-32
Scytalone dehydratase	1STD	172	74,38%	86%	4e-91
	3STD	165	74,38%	86%	6e-91
	4STD	164	74,38%	86%	7e-91
	1IDP	172	73,75%	86%	6e-90
3HNR	1YBV	283	74,71%	100%	1e-85
	1DOH	283	74,71%	100%	1e-85
	3IS3	270	63,31%	99%	9e-70
	3ITD	270	62,72%	99%	5e-69
4HNR	1YBV	283	74,71%	100%	1e-85
	1DOH	283	74,71%	100%	1e-85
	3IS3	270	63,31%	99%	9e-70
	3ITD	270	62,72%	99%	5e-69
Thioredoxin peroxidase	3SBC	216	65,10%	85%	1e-89
	5EPT	217	63,35%	85%	2e-86
	5DVB	217	62,83%	85%	6e-85
	6UTL	216	62,83%	85%	6e-85

Thioredoxin réductase	6BPY	374	59,63%	100%	1e-158
	5W4C	371	61,06%	94%	3e-141
	3ITJ	338	60,25%	90%	2e-133
	3D8X	326	60,31%	89%	3e-132

La couverture de la requête est le pourcentage de la longueur de la requête incluse dans l'alignement. D'après nos résultats tous les templates sélectionnés ont un pourcentage de couverture supérieur à 70%, exception faite pour le template 1EE6 de la pecate lyase qui a montré le pourcentage de couverture le plus faible (=41%) (**Tableau 24**).

1.2.Modélisation homologue des enzymes cibles

Cette étape a été réalisée en utilisant le programme Modeller version 10.1. Les séquences résultantes répondant aux critères de sélection précédemment discutés ont été sélectionnées pour une modélisation d'homologie comparative. Les fichiers ".pdb" respectifs des protéines templates ont été téléchargés et utilisés comme matrices. Il existe plusieurs critères pour sélectionner le meilleur modèle parmi les différents modèles générés par Modeller 10.1. Les critères le plus important et largement pratiqué incluent la sélection du modèle avec le score DOPE score « Énergie Protéique Discrète Optimisée » le plus bas.

Les meilleurs modèles choisis pour les protéines sont résumés dans le **tableau 25**.

Tableau 25. Résultats de score DOPE des meilleurs modèles

Enzyme cible	DOPE score (Kcal/mol)
Cystathionine β-lyase	-42010,35156
Glutathione reductase	-47868,01172
Pecate lyase	-20865,27148
Homoserine O-acétyltransférase	-47908,71094
Scytalone déshydratase	-18557,57813
Thioredoxin peroxidase	-23433,55664
Thioredoxin réductase	-32814,88672
3HNR	-27961,42969
4HNR	-26139,03711

Un score DOPE est une méthode basée sur le potentiel de distance entre les atomes et est utilisée comme fonction de score dans MODELLER (**Takei et Ishida, 2022**). DOPE est un potentiel statistique dépendant de la distance atomique basé sur un état physique de référence qui explique la taille finie et la forme sphérique des protéines par exemple atomes C, les angles, les distances, l'accessibilité au solvant (**Lam et al., 2017**).

Les modèles avec les scores DOPE relativement faible ont été sélectionnés pour des calculs supplémentaires car les valeurs de faible score DOPE indiquent une structure 3D plus stable (**Muhammed et al., 2019**).

2. Evaluation des modèles protéiques

La validation des modèles est utilisée pour vérifier toute erreur ou déviation potentielle par rapport à la protéine normale. Cette étape est de la plus haute importance pour une étude d'amarrage moléculaire (**Guo et al., 2020**).

L'évaluation RMSD (Root Mean Square Deviation) ou déviation quadratique moyenne des positions atomiques, est un outil efficace pour obtenir des informations sur la conformation d'une protéine. Le RMSD mesure la différence entre les positions des atomes C entre deux protéines. Le RMSD de deux structures alignées indique leur divergence l'une par rapport à l'autre. Plus l'écart est petit, plus les deux protéines sont spatialement équivalentes (**Sefid et al., 2013**).

A l'aide du logiciel Pymol, les valeurs de RMSD des protéines modèles sont calculées et mentionnées dans le **tableau 26**.

Tableau 26. Résultat des valeurs RMSD des protéines modélisées.

Enzyme cible	RMSD
Cystathionine β -lyase	0,106 (309 atomes C alignés)
Glutathione reductase	0,159 (376 atomes C alignés)
Pecate lyase	0,398 (120 atomes C alignés)
Homoserine O-acétyltransférase	0,104 (273 atomes C alignés)
Scytalone déshydratase	0,115 (139 atomes C alignés)
Thioredoxin peroxidase	0,093 (149 atomes C alignés)
Thioredoxin réductase	0,266 (292 atomes C alignés)
3HNR	0,285 (260 atomes C alignés)
4HNR	0,102 (214 atomes C alignés)

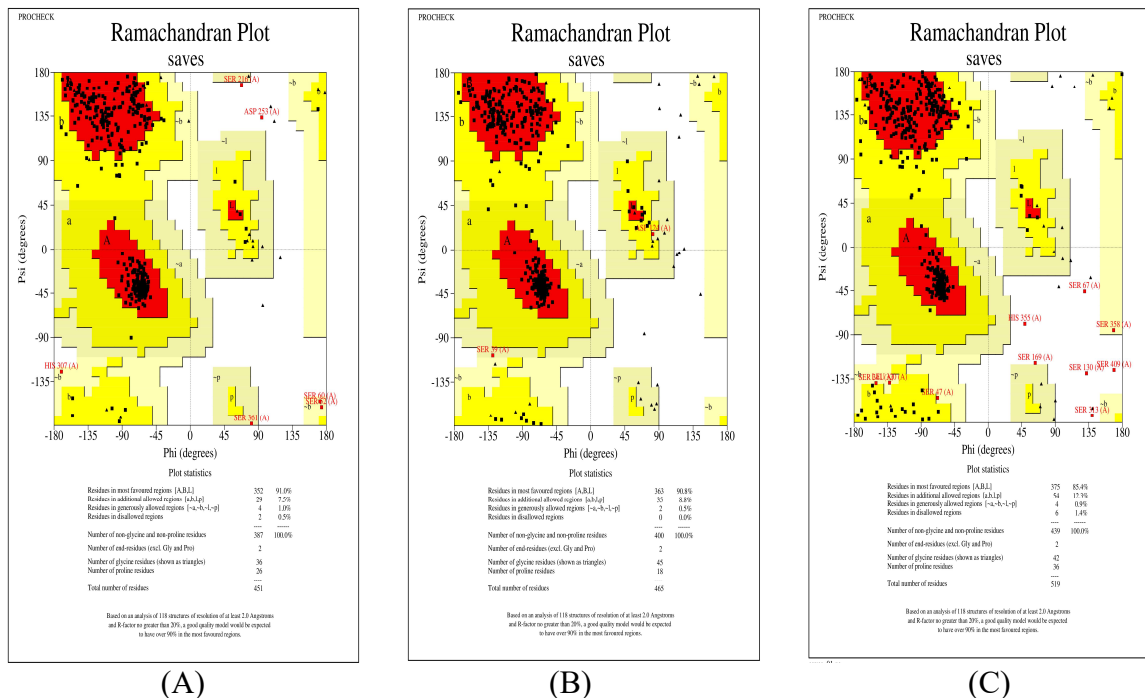
On remarque que tous les résultats de RMSD des protéines étudiées sont bas et inférieur à 2,0Å. Ces résultats reflètent un bon appariement des modèles avec leurs protéines templates cristallisés. **Xiao et al., (2018)** rapportent qu'une valeur RMSD inférieure à 2,0Å est un excellent indicateur de la fiabilité du modèle protéique. De même, **Ramirez et Caballero, (2018)** ont utilisé trois classifications de RMSD différentes : (a) bonne solution lorsque $\text{RMSD} \leq 2,0 \text{ \AA}$, (b) solutions acceptables lorsque RMSD est compris entre 2,0 et 3,0 Å, et (c) mauvaises solutions lorsque $\text{RMSD} \geq 3,0 \text{ \AA}$.

La qualité stéréochimique et la précision des modèles ont été testées à l'aide des programmes PROCHECK, VERFIY3D et ERRAT, leurs résultats sont mentionnés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 27**).

Tableau 27. Résultat des scores de la qualité des modèles étudiés par les différents programmes d'évaluation

Modèles des protéines étudiées	Ramachandran Plot		Verify 3D (score \geq 0.2)	ERRAT	Z-score	Qmean Dis Co
	Régions les plus préférées	Les résidus dans la région interdite				
Homoserine O acetyl transférase	85,4%	1,4%	69,75%	52,8662	-7,93	0,62
Thioredoxin reductase	88,6%	0,3%	84,83%	75,7925	-7,46	0,73
Thioredoxin peroxidase	92,8%	0,5%	86,16%	76,7442	-7,22	0,71
Glutathione reductase	90,8%	0%	92,26%	73,5683	-9,82	0,76
Pecate lyase	80,2%	0,5%	76,54%	47,8632	-4,28	0,49
Scytalone déhydratase	90,2%	0%	78,92%	79,6407	-5,38	0,76
Cystathionine beta – lyase	91,0%	0,5%	78,94%	63,7647	-8,88	0,70
3HNR	92,1%	0,4%	94,76%	97,2763	-7,62	0,83
4HNR	92,2%	0,9%	93,16%	88,6275	-7,62	0,78

L'analyse PROCHECK a fourni un graphique nommé graphique de Ramachandran pour chaque modèle protéique. Ce graphe montre les schémas de distribution des résidus dans différentes régions (**Figure 44**).



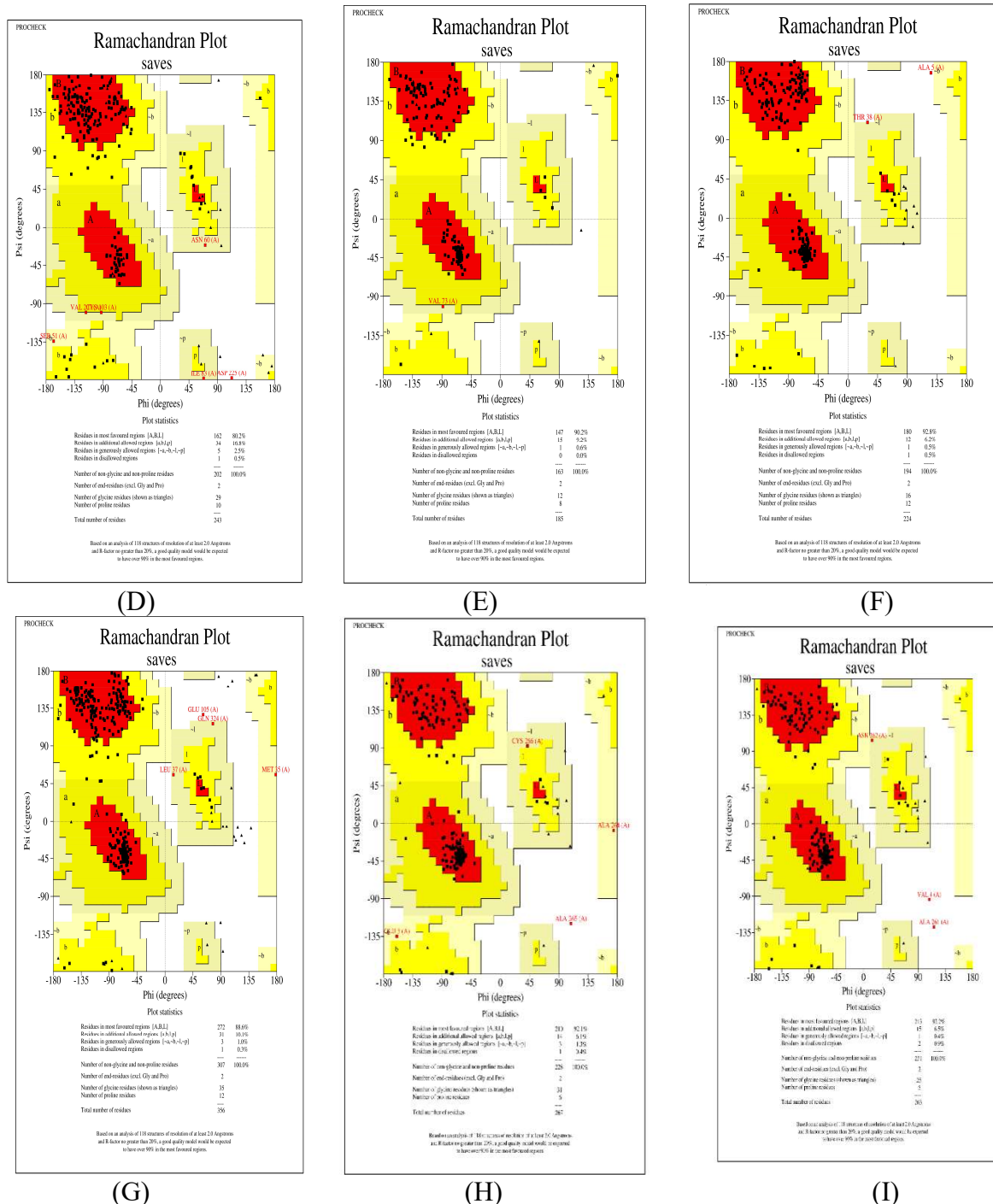


Figure 44. Résultat de l'analyse de PROCHECK des enzymes modèles (A: cystathionine beta – lyase, B: Glutathione reductase, C: Homoserine O acetyl transférase, D: pécate lyase, E: Scytalone déshydratase, F: thioredoxin peroxidase, G: Thioredoxin reductase, H: 3HNR, I: 4HNR).

Le graphique de Ramachandran est l'une des méthodes les plus anciennes et les plus fiables de détermination de la qualité de la structure des protéines. Il décrit la distribution bidimensionnelle des angles de torsion du squelette protéique (ϕ , ψ) (Sobolev *et al.*, 2020). Cette analyse affiche les angles de torsion ϕ et ψ de la chaîne principale pour chaque résidu. Les résidus ont tendance à se regrouper dans certaines régions privilégiées et sont

exclus de certaines régions non autorisées principalement en raison de l'encombrement stérique entre la chaîne latérale C_β et la chaîne principale en formant les hélices α et feuilletés β . La glycine et la proline ont des distributions différentes, où les régions favorisées sont doublées en raison de l'absence de chaîne latérale pour la glycine, et l'angle ψ est fortement limité à -60° pour la proline (Elslinger et Wilson, 2012).

D'après les graphiques, il est facile de voir que certaines régions contiennent beaucoup plus de points noirs que d'autres. Celles-ci sont appelées régions autorisées et les angles correspondants sont appelés angles autorisés ou favorables (régions rouges et jaunes). D'autres régions sont moins favorables et sont peu peuplées dans des structures de bonne qualité (couleur beige). Ceci est le résultat d'un encombrement stérique, certaines rotations autour de la chaîne polypeptidique rapprocheront trop les atomes les uns des autres, créant une répulsion stérique. Pour cette raison, le tracé de Ramachandran sert d'indicateur important de la qualité des structures tridimensionnelles. Cependant, nous pouvons parfois trouver des acides aminés avec mauvais angles de torsion pour une bonne raison : la présence d'haute énergie créée dans une structure par certains résidus dans des angles défavorables peut être utilisée par la protéine créant des régions défavorables. Une autre exception au principe de regroupement autour des régions α et β est fournie par la glycine. La glycine n'a pas de chaîne latérale, ce qui permet une grande flexibilité dans la chaîne polypeptidique, rendant accessibles des angles de rotation autrement interdits. C'est pourquoi la glycine se trouve dans les régions en boucle, où la chaîne polypeptidique doit faire un virage serré. La proline contrairement à la glycine fixe les angles de torsion, très proche de celle d'un brin β allongé (Ramachandran *et al.*, 1963).

Les acides aminés avec des angles de torsion compris entre $-180 < \phi < 0^\circ$, $-100 < \psi < 45^\circ$ sont considérés comme étant dans la région de l'hélice α . Les acides aminés avec des angles de torsion compris entre $-180 < \phi < -45^\circ$, $45 < \psi < 180^\circ$ sont considérés comme étant dans la région du feuilleté β . La zone $0 < \phi < 180$, $-90 < \psi < 90$ est appelée la région de virage (Hovmöller *et al.*, 2002).

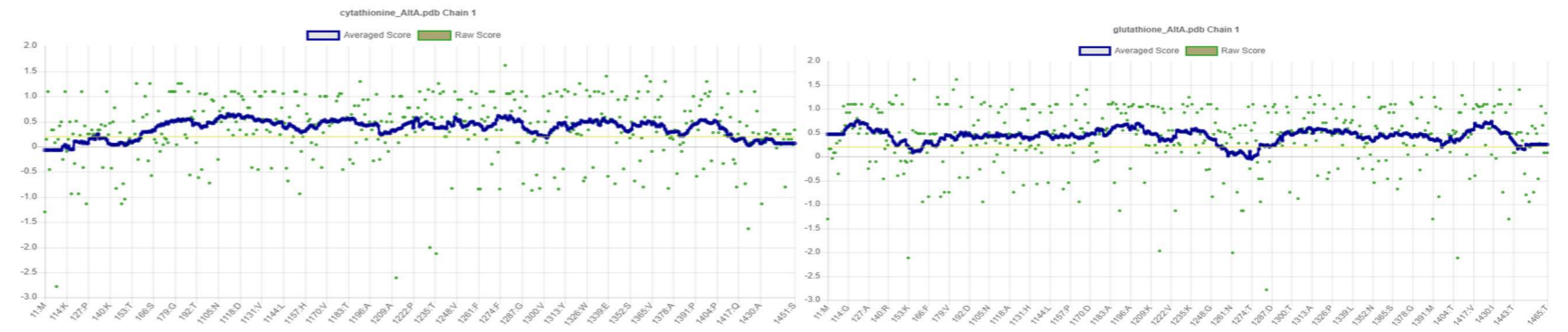
Les régions favorables correspondent aux structures secondaires régulières et sont regroupés en trois régions principales : (1) une conformation de feuilleté β dans le quadrant supérieur gauche, (2) d'hélices α droites en haut du quadrant inférieur gauche, et (3) hélices α à gauche du coin supérieur du quadrant droite (Elslinger et Wilson, 2012). D'après les résultats obtenus pour nos protéines modélisées, la majorité des résidus des modèles se situent

dans les trois régions favorables. De tels chiffres attribués par le graphique de Ramachandran représentent une bonne qualité des modèles prédits.

En remarquant que les modèles des enzymes thioredoxin peroxidase, glutathione reductase, scytalone déshydratase, cystathionine beta-lyase, 3HNR et 4HNR présentent des résidus dans les régions favorisées avec des pourcentages supérieurs à 90%. Cela signifie que ces enzymes ont une structure de bonne qualité. Au contraire, les modèles des enzymes homoserine O acetyl transférase, thioredoxin reductase et pecate lyase ont des pourcentages de résidus favorisés inférieurs à 90%. Cela signifie que ses structures ont une qualité stéréochimique plus faible que le premier groupe. Une structure avec $\geq 90\%$ de ses résidus dans les régions les plus favorisées est considérée comme une structure de bonne qualité (**Rai et Rieder, 2012**).

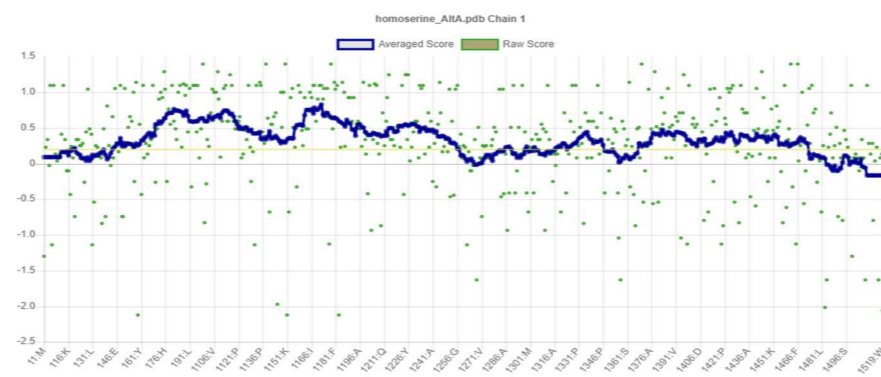
La stratégie Verify3D évalue la structure des protéines en utilisant des profils tridimensionnels. Verify 3D Détermine la compatibilité d'un modèle atomique (3D) avec sa propre séquence d'acides aminés (1D) en attribuant une classe structurale en fonction de son emplacement et de son environnement (alpha, bêta, boucle, polaire, non polaire, etc.) et en comparant les résultats aux bonnes structures (**Beg et al., 2018**). Chaque position de résidu dans le modèle 3D est caractérisée par son environnement et est représentée par une rangée de 20 chiffres dans un « profil 3D » (axe des x). Ces nombres sont les préférences statistiques, appelées scores 3D-1D, de chacun des 20 acides aminés pour cet environnement. Les environnements de résidus sont définis par trois paramètres : la zone du résidu enfoui dans la protéine et inaccessible au solvant, la fraction de la zone de la chaîne latérale couverte par les atomes polaires (O et N) et la structure secondaire locale. Le score de profil 3D, représentent la compatibilité de la séquence avec le modèle qui est la somme de toutes les positions de résidus, des scores 3D-1D pour la séquence d'acides aminés de la protéine. La prédiction d'une structure protéique à partir d'une séquence nécessite un lien entre la structure 3D et la séquence 1D. Le programme VERIFY3D fournit ce lien en réduisant une structure 3D à une chaîne 1D de classes environnementales. Par conséquent, la méthode peut être utilisée pour évaluer n'importe quel modèle protéique ou pour mesurer la compatibilité de n'importe quelle structure protéique avec sa séquence d'acides aminés (**Eisenberg et al., 1997**). Les modèles qui sont largement incorrects ou les modèles qui contiennent un petit nombre de segments mal construits peuvent être détectés par des régions à faible score dans le profil 3D (sous la barre). La figure 45 représente les profils 3D tracés contre les séquences en acides aminés des enzymes modélisées. Les modèles prédites montrent des profils avec des scores moyennes

(average scores) supérieures à 0 tout au long de la majorité des modèles. Quelques exceptions sont également à noter où les scores moyennes de quelques segments protéiques descendent au-dessous du 0, cela peut être expliqué par des incohérences de correspondance de la structure 3D de ces segments avec leurs séquences en acides aminés. Ces situations apparaissent probablement dans les parties des loops protéiques qui sont des régions plus flexibles du reste de la conformation 3D.



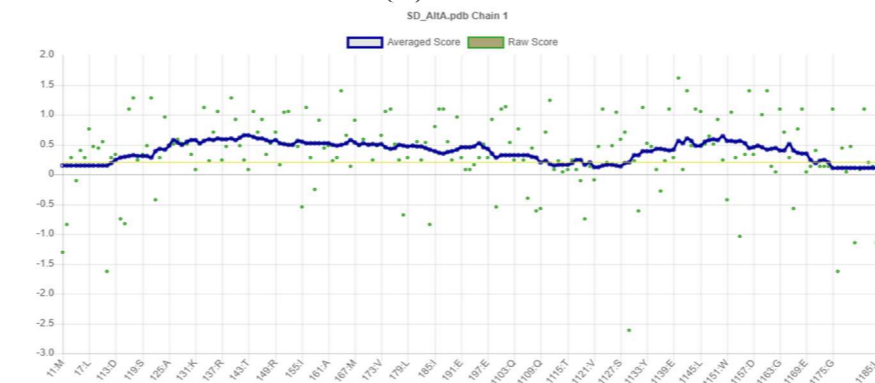
(A)

(B)



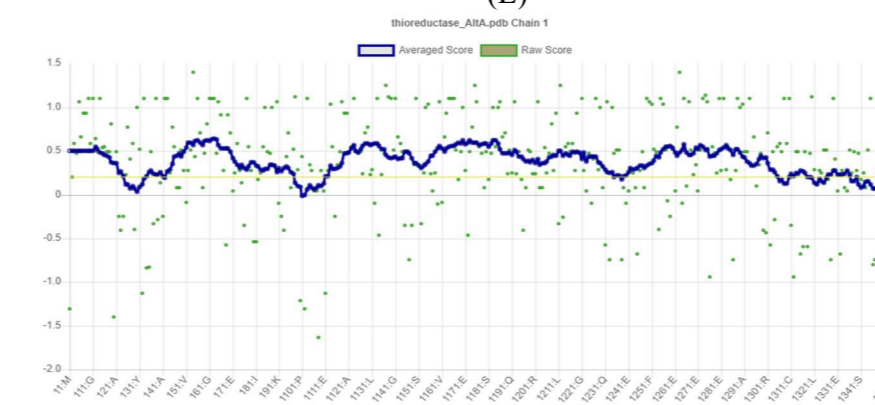
(C)

(D)



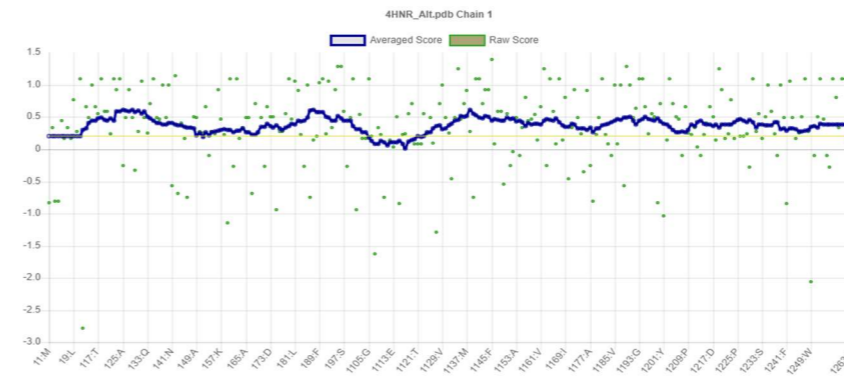
(E)

(F)



(G)

(H)



(I)

Figure 45. Résultat de l'analyse Verify 3D des enzymes modèles (A : cystathionine beta – lyase, B : Glutathione reductase, C : Homoserine O acetyl transférase, D : pecate lyase, E : Scytalone déhydratase, F : thioredoxin peroxidase, G : Thioredoxin reductase, H : 3HNR, I : 4HNR).

Les valeurs de Verify3D des protéines modèles étudiées varient entre 69,75% et 94,76% (**Tableau 27**). Selon **Eisenberg et al., (1997)**, pour qu'une structure protéique soit qualifiée de suffisamment fiable, elle doit avoir au moins un score de compatibilité (3D-1D) de 80%. Les enzymes thioredoxin reductase, thioredoxin peroxidase, glutathione reductase, 3HNR et 4HNR ont des valeurs supérieures à 80%. Cependant, les enzymes scytalone déhydratas, cystathionine beta lyase, homoserine *O* acetyl transférase et pecate lyase ont des valeurs inférieures à 80%. Par conséquent, les structures 3D du premier groupe des enzymes modélisée sont considérées comme ayant une qualité stéréochimique très satisfaisante.

ERRAT est un serveur qui approuve la structure des protéines sur la base de la connexion non covalente (non-liée) entre différentes sortes d'atomes (**Beg et al., 2018**). Le programme ERRAT analyse donc les fréquences relatives des interactions non covalentes entre atomes de différents types. Trois types d'atomes sont considérés (C, N et O), et par conséquent six types d'interactions sont possibles (CC, CN, CO, NN, NO et OO). ERRAT fonctionne sous l'hypothèse que différents types d'atomes seront distribués de manière non aléatoire les uns par rapport aux autres dans les protéines en raison de considérations géométriques et énergétiques complexes, et que des erreurs structurelles conduiront à des anomalies détectables dans le schéma des interactions. L'évaluation des interactions non liées est soumise aux restrictions suivantes : la distance entre les deux atomes dans l'espace est inférieure à une limite prédéfinie, généralement 3,5 Å, et les atomes dans le même résidu ou ceux qui sont liés de manière covalente l'un à l'autre ne sont pas considérés (**Colovos et Yeates, 1993**).

L'analyse ERRAT a été effectuée pour vérifier la configuration du squelette 3D des modèles prédits. Les résultats obtenus sont regroupés dans la **figure 46**. Les valeurs d'erreur sont tracées en fonction de la position d'une fenêtre glissante à 9 résidus. La fonction d'erreur est basée sur les statistiques des interactions atome-atome non liées dans la structure rapportée (par rapport à une base de données de structures fiables à haute résolution). Dans la figure 46, il est possible de distinguer 3 régions différentes pour chaque modèle reflétant différents niveaux de confiance. Les régions de la structure qui peuvent être rejetées au niveau de confiance de 95 % sont jaunes ; en cas générale on s'attend à ce que 5 % d'une bonne structure protéique ait une valeur d'erreur supérieure à ce niveau. Les régions pouvant être rejetées au niveau de 99 % sont indiquées en rouge. Les régions non colorées en revanche reflètent un bon niveau de confiance de la structure prédite à ces niveaux.

En général, une structure à haute résolution génère des valeurs égales ou supérieures à 95 (**Colovos & Yeates, 1993**). Avec une valeur de 97,2763, la structure modélisée de 3HNR d'*A. alternata* est donc

considérée comme de très haute qualité stéréochimique. Celle-ci est suivie par le modèle 4HNR avec une valeur de 88,6275 où les régions non colorées de ces deux modèles sont plus nombreuses indiquant donc un bon niveau de confiance (**Figure 46**). Alors que les deux enzymes Homoserine *O* acetyl transférase et Pecate lyase ont présenté les plus faibles valeurs (52,8662, 47,8632, respectivement) et leurs graphes présentent plusieurs régions rouges indiquant un faible niveau de confiance.

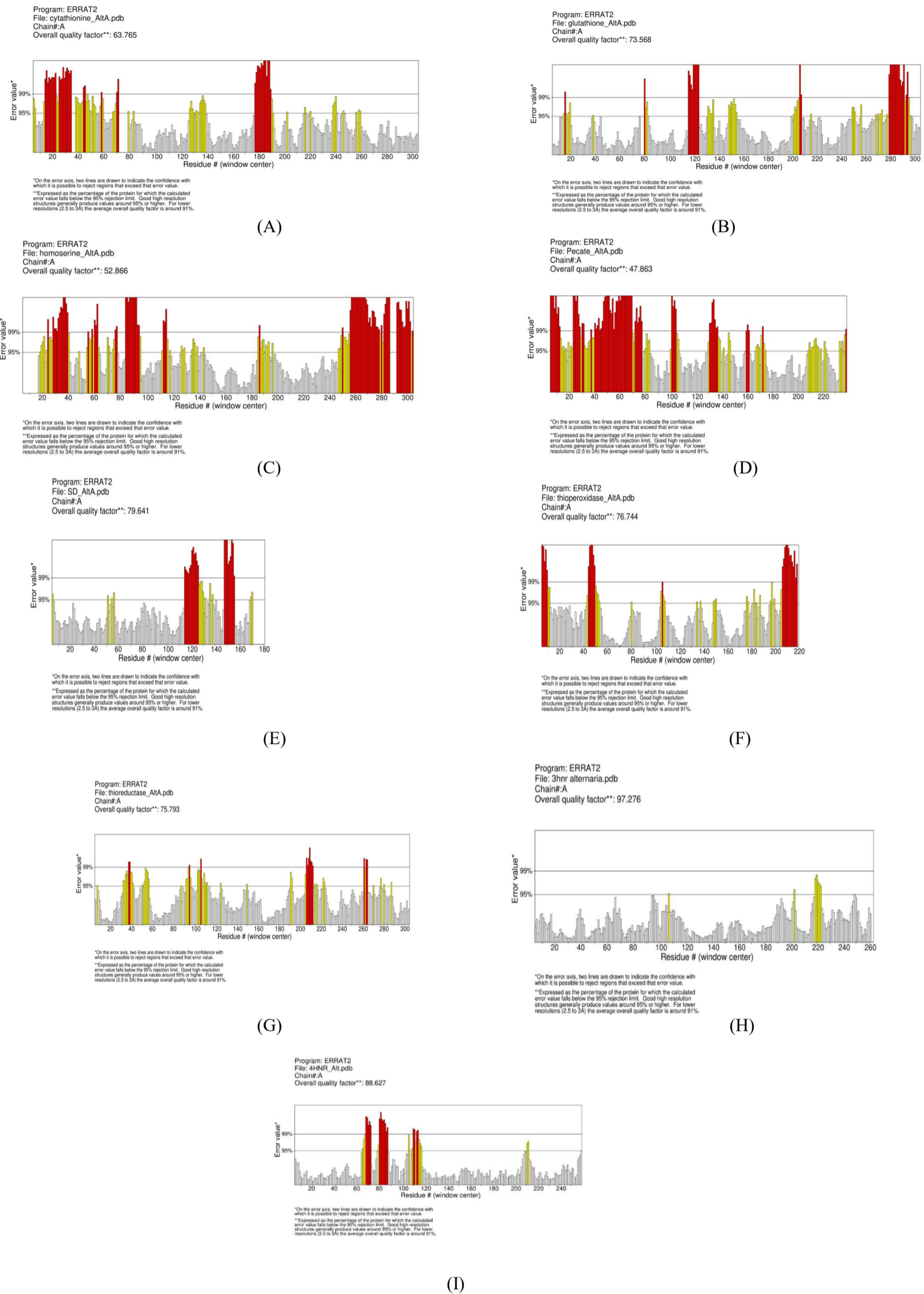


Figure 46. Résultat de l'analyse ERRAT des enzymes modèles (A : cystathionine beta – lyase, B : Glutathione reductase, C : Homoserine O acetyl transférase, D : pecate lyase, E : Scytalone déshydratase, F : thioredoxin peroxidase, G : Thioredoxin reductase, H : 3HNR, I : 4HNR).

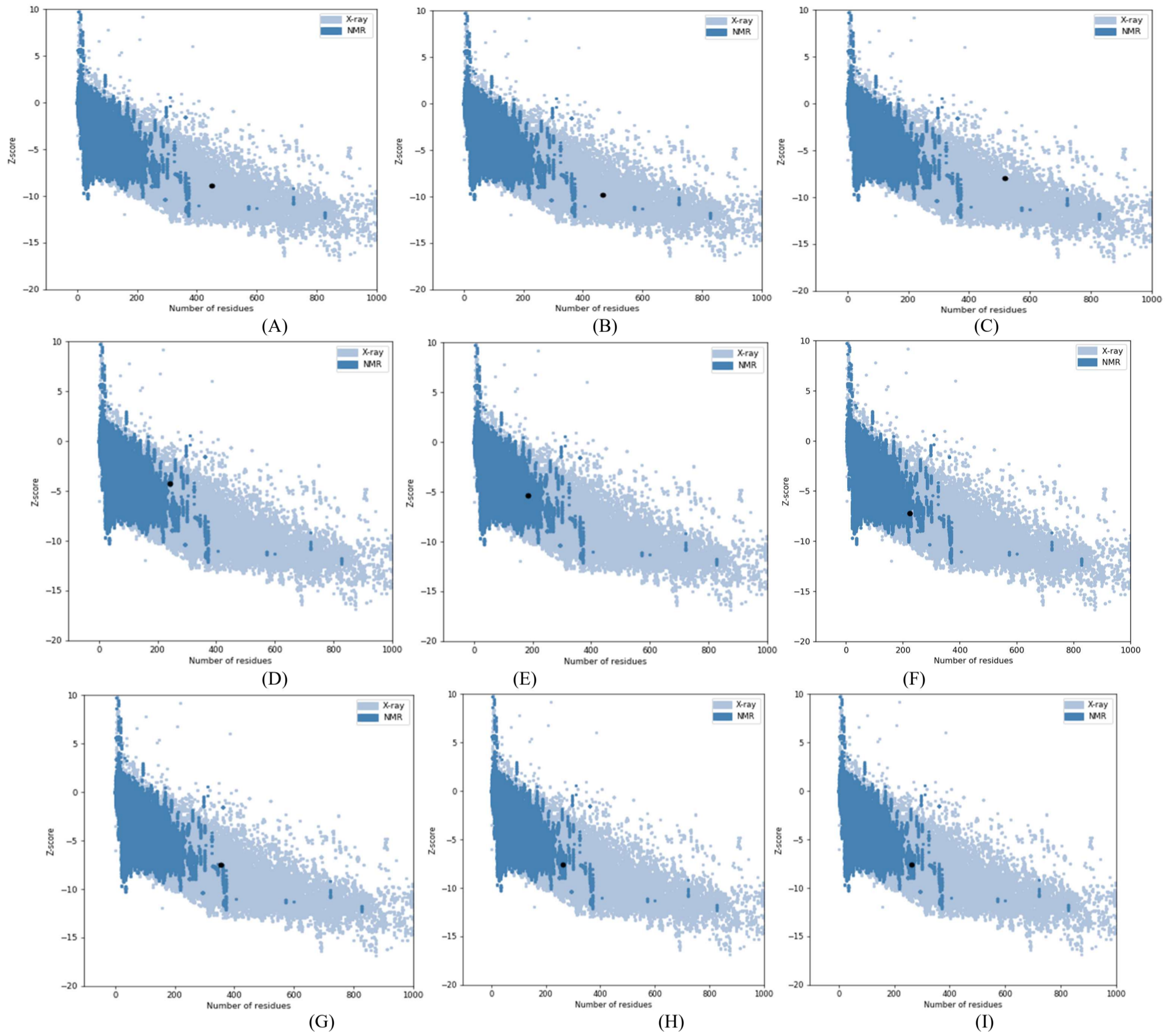
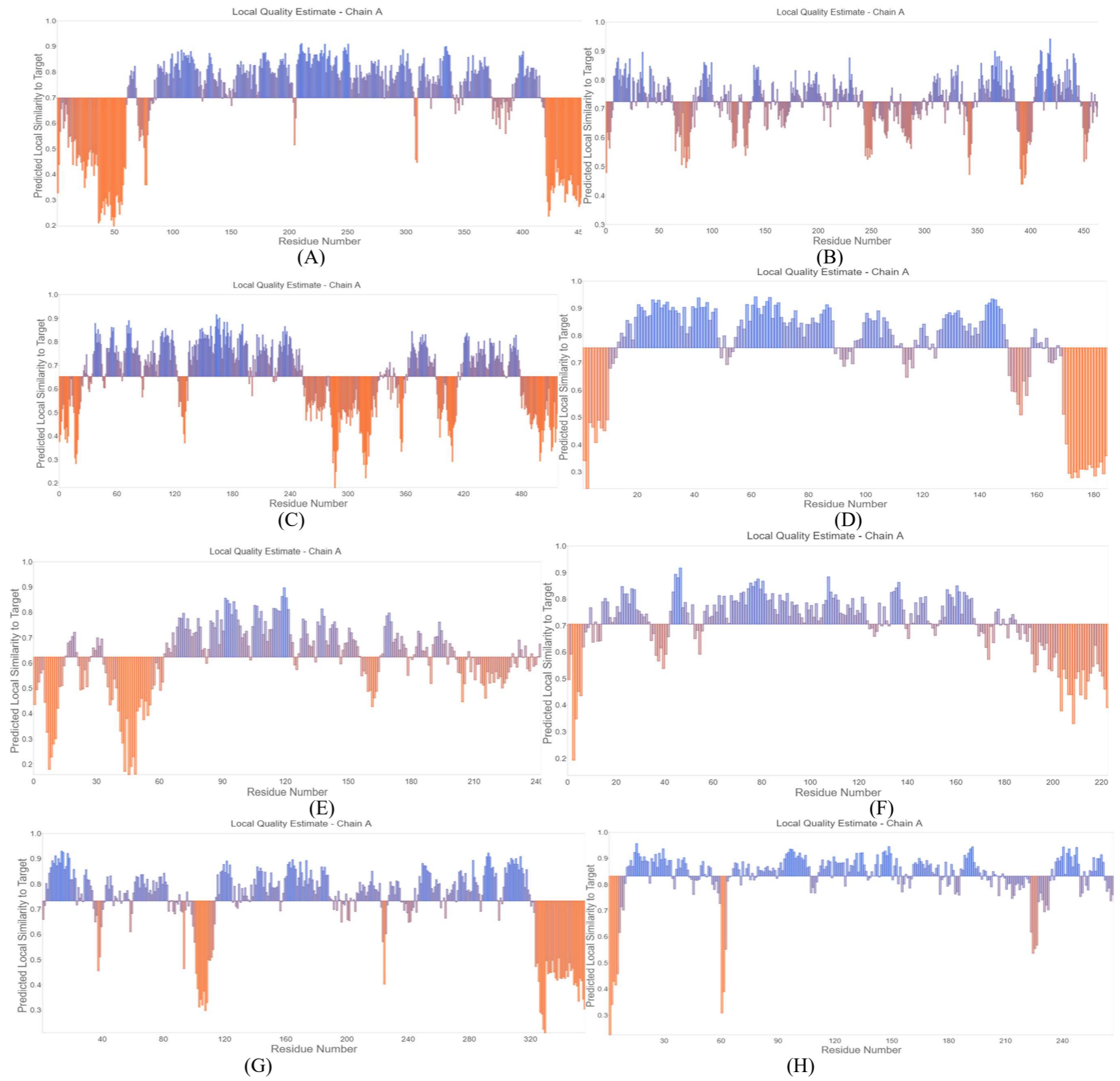
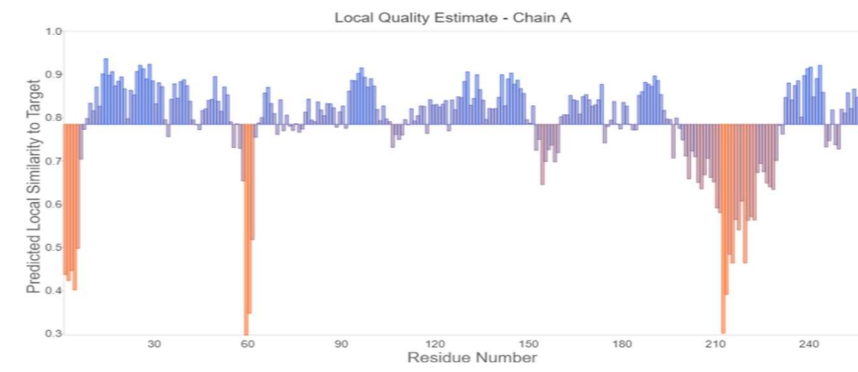


Figure 47. Résultat de l'analyse ProSA et Z-score des enzymes modèles (A : cystathionine beta – lyase, B : Glutathione reductase, C : Homoserine O acetyl transférase, D : pecate lyase, E : Scytalone dehydratase, F : thioredoxin peroxidase, G : Thioredoxin reductase, H : 3HNR, I : 4HNR).

L'outil PROSA est un autre moyen d'évaluation de la qualité des modèles prédits, il fournit des informations sur la qualité globale des modèles. La qualité globale du modèle est représentée par le Z-score, plus la valeur est négative, meilleure est la précision de la structure (**Beg *et al.*, 2018**). Le score Z sert d'indicateur de la qualité globale des structures 3D prédites et détermine l'écart d'énergie moyen en ce qui concerne la distribution d'énergie dérivée de conformations aléatoires (**Numan *et al.*, 2021**). Pour les modèles prédits dans cette étude, les scores Z varie de -4.28 et -9.82 (**Tableau 27**). Comme le montre la **figure 47**, le point noir pour chaque modèle montre que le score Z du modèle se situe dans la plage des scores trouvés pour les protéines natives de taille similaire dans PDB. Z-score avec des valeurs nulles et négatives sont liées aux modèles les plus stables (**Pourseif *et al.*, 2019**). En général, les valeurs positives correspondent à une partie mauvaise ou erronée d'un modèle (**Hooda *et al.*, 2012**). Le Z-score négatif du modèle d'homologie est obligatoire pour détenir la caractéristique d'être un bon modèle (**Negi *et al.*, 2013**).

QMEAN DisCo est une fonction de notation composite capable de dériver des estimations de qualités globales (c'est-à-dire pour l'ensemble de la structure) et locales (c'est-à-dire par résidu) sur la base d'un modèle unique en évaluant l'accord des distances résidu-résidu par paires avec des ensembles de contraintes de distance (DisCo) extraites de structures homologues au modèle évalué. Le score QMEANDisCo est l'estimation d'erreur fournie pour un grand nombre de modèles. Comme la fiabilité de la prédiction dépend fortement de la taille du modèle, l'estimation d'erreur fournie est calculée sur la base de modèles de taille similaire à l'entrée (**Studer *et al.*, 2020**). L'analyse QMEAN DisCo a également été utilisée pour évaluer et valider les modèles et ses résultats sont illustrés dans la **figure 48**.





(I)

Figure 48. Résultat de l'analyse QMEAN DisCo des enzymes modèles (A : cystathionine beta – lyase, B : Glutathione reductase, C : Homoserine O acetyl transférase, D : pecate lyase, E : Scytalone déhydratase, F : thioredoxin peroxidase, G : Thioredoxin reductase, H : 3HNR, I : 4HNR).

Les valeurs de QMEAN DisCo des protéines étudiées varient entre 0,49 et 0,83. Le modèle de la pectate lyase a montré la plus faible valeur (QMEAN DisCo=0,49), alors que la plus haute valeur a été émise par le modèle 3HNR (QMEAN DisCo=0,83) (**Tableau 27**). Il a été rapporté que des scores QMEAN avec des valeurs qui tournent autour de zéro reflètent une grande concordance entre les structures modèles et structures expérimentales de taille similaire, alors que des scores de -4,0 et moins indiquent que les modèles sont de mauvaises qualités (**Bahar et al., 2019**). Dans les graphes obtenus dans la figure 48, les pics bleus reflètent les segments de protéine avec un niveau de confiance élevé, alors que les pics rouges présentes sous la barre reflètent des segments avec des niveaux de confiance faibles. On peut donc conclure que nos modèles sont de qualité satisfaisante.

En se basant sur l'ensemble des résultats obtenus depuis les différents tests d'évaluation des enzymes modélisées de *A. alternata*, la protéine modélisée 3HNR a montré la plus grande stabilité parmi les modèles prédits. Ce modèle s'est avéré avoir une structure stable et suffisamment bonne et fiable pour être utilisée dans une enquête *in silico* comme cible pour les biofongicides. De l'autre côté, le modèle de la pectate lyase s'est révélé avoir moins de stabilité, et qu'il doit subir une étape supplémentaire de minimisation avant d'être utilisé dans le docking moléculaire. De même, les autres modèles nécessitent une étape de minimisation de leur énergie dans une tentative de corriger les contraintes atomiques et de se rapprocher à l'état natif de chaque enzyme.

3. Prédiction de site active de protéine modèle

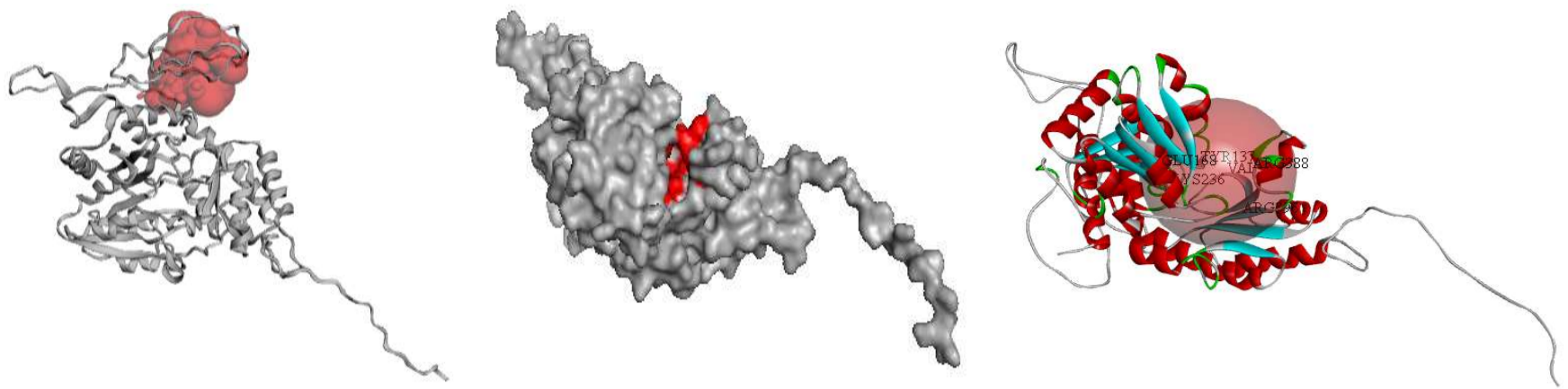
L'analyse des structures protéiques pour le site actif est souvent considérée comme le point de départ des études d'amarrage protéine-ligand. Le site actif d'une enzyme comprend un site de liaison au substrat et un site catalytique. L'enzyme se lie à un substrat spécifique afin de catalyser une réaction chimique, tandis que le site catalytique se trouve à côté du site de liaison, effectuant la catalyse. Certaines enzymes nécessitent l'aide de cofacteurs pour leurs activités. La plupart des cofacteurs sont connectés au site actif de l'enzyme (**Hasan et al., 2021**).

Les sites actifs des structures modèles ont été analysés à l'aide du serveur CASTp et les résidus d'acides aminés des sites actifs ont également été déterminés. Le résultat a ensuite été visualisé à l'aide de PyMOL et Discovery Studio (**Tableau 28**).

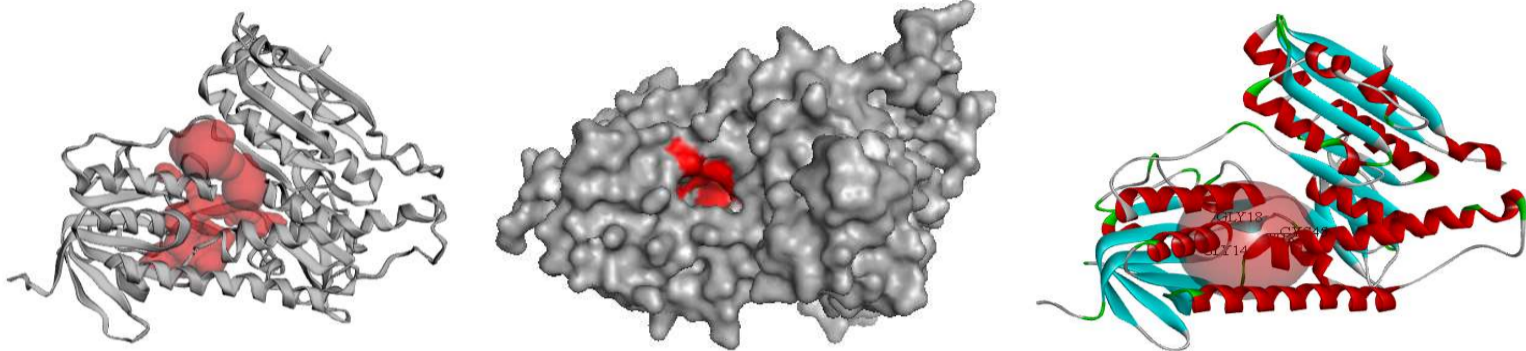
Tableau 28. Résultat de résidus catalytiques des sites actifs des enzymes modèles et templates

Enzymes	Résidus catalytiques de tamplate	Résidus catalytiques de l'enzyme modèle
Cystathionine béta lyase	Lysine278, Tyrosine181, Aspartate253, Glycine157, Thréonine277, Arginine129, Tyrosine127, Méthionine158 (Breitinger et al., 2001).	Arginine388, Tyrosine137, Valine360, Arginine396, Lysine236
Homoserine O-acétyltransférase,	Sérine149, Histidine362, Aspartate333 (Lejon et al., 2008).	Leucine78, Méthionine170, Leucine386, Tyrosine198, Phénylalanine433, Leucine432.
Glutathione réductase	Cystéine61, Cystéine66 (Yu et Zhou, 2007).	Cystéine45, Glycine14, Glycine18, Thréonine44
Pecate lyase	Lysine224, Lysine249, Argénine252, Aspartate 195 (Creze et al., 2008).	Aspartate84, Asparagine133, Cystéine158, Glycine52
Scytalone déhydratase	Histidine110, Valine108, Aspartate31, Histidine85, Tyrosine30, Sérine129, Asparagine131, Tyrosine50 (Lundqvist et al., 1994).	Histidine83, Valine106, Tyrosine28, Tyrosine48, Leucine167, Arginine164
Thioredoxin peroxidase	Thréonine44, Arginine123, Sérine47, Glutamate50, Arginine146, Proline40, Cystéine170 (Tairum et al., 2012).	Thréonine54, Arginine133, Proline50, Valine56
Thioredoxin réductase	Cystéine145, Cystéine148, Aspartate149, Thréonine50, Thréonine49, Thréonine48, Thréonine47, Alanine41, Valine152, Glutamine139, Isoleucine154, Phénylalanine155 (Marshall et al., 2019)	Cystéine145, Cystéine148, Thréonine48, Thréonine47, Arginine128, Sérine143
3HNR	Sérine164, Isoleucine165, Tyrosine178, Méthionine215, Tyrosine216, Cystéine220, Tyrosine223, Méthionine283, Tryptophane243 (Liao et al., 2001).	Sérine149, Isoleucine150, Tyrosine163, Glycine195, Tyrosine208, Méthionine200
4HNR	Valine118, Sérine164, Isoleucine165, Tyrosine178, Glycine210, Méthionine215, Valine219, Cystéine220, Tyrosine223, Tryptophane243 Méthionine283 (Andersson et al., 1996).	Sérine148, Tyrosine162, Isoleucine149, Histidine102, Glycine194, Méthionine199, Glycine203, Valine207, Arginine204.

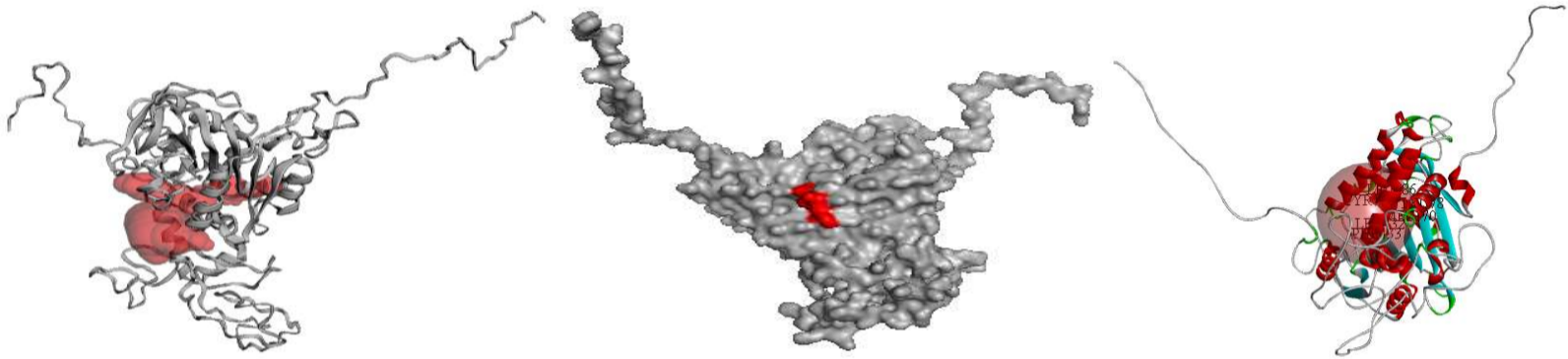
Les poches prédites par CASTp et les résidus catalytiques des protéines modèles visualisés par Pymol sont illustrées à **la figure 49** ; ou les sites actifs et leurs acides aminés sont colorés en rouge.



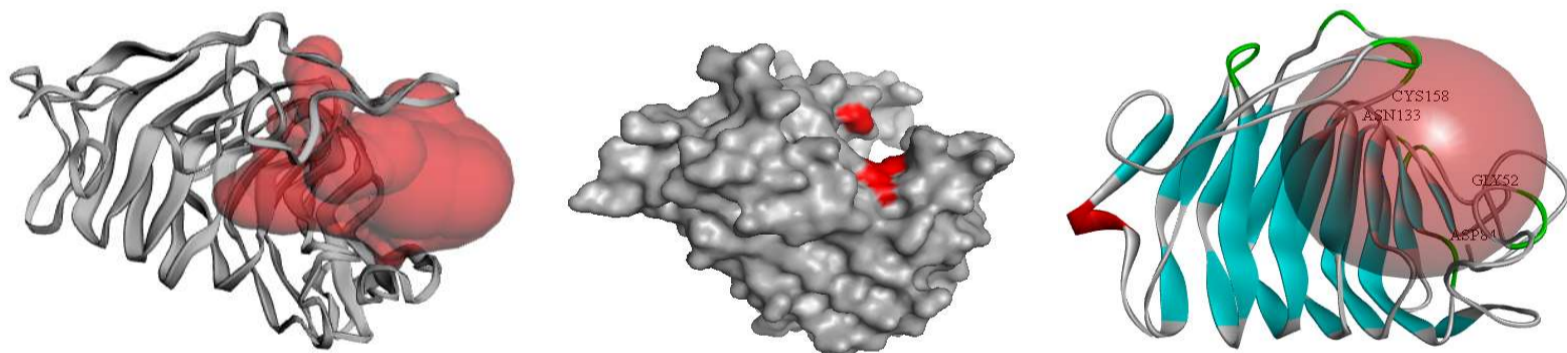
(A)



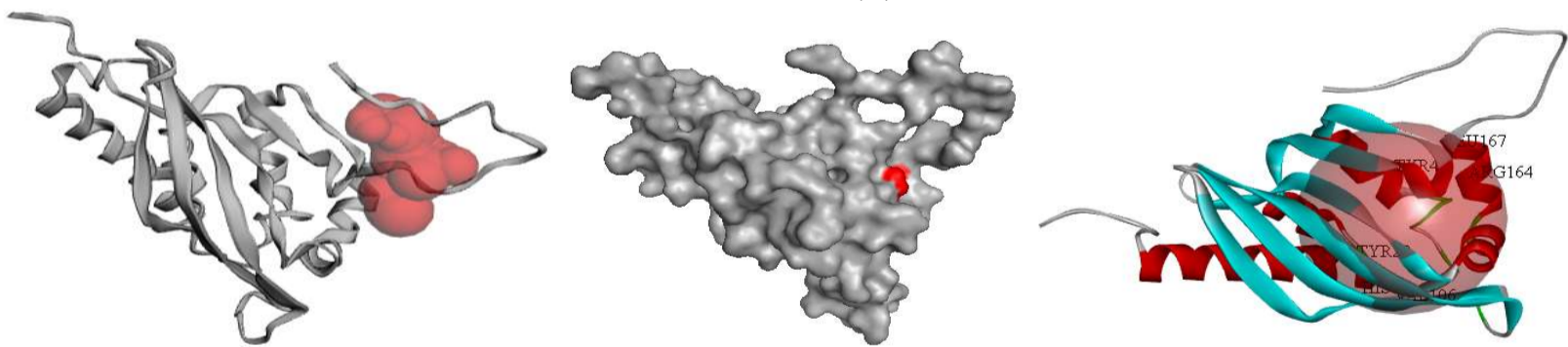
(B)



(C)



(D)



(E)

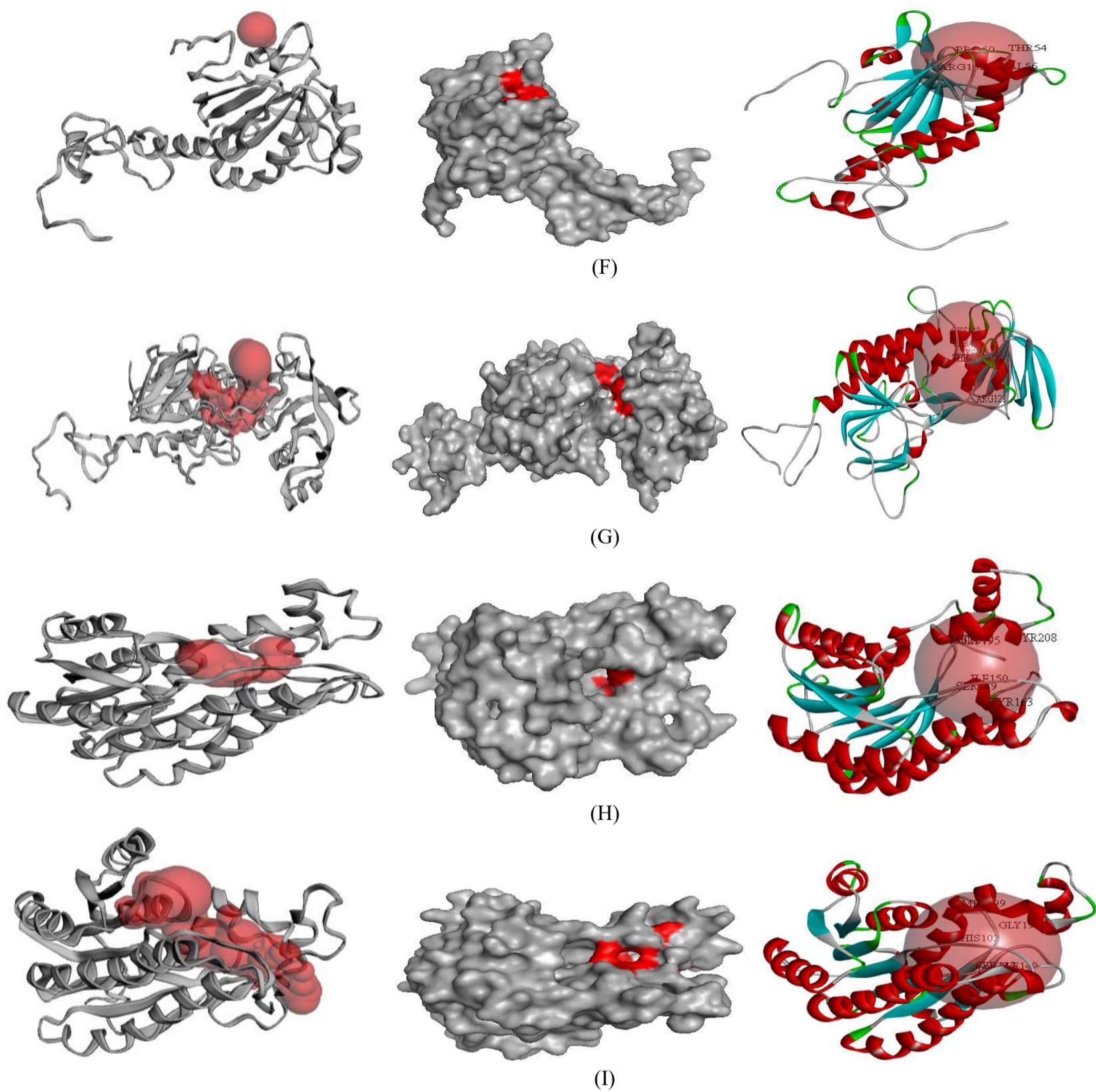


Figure 49 : résultat de l'analyse de sites actifs des enzymes modèles par le serveur CastP, Pymol et Discovery Studio (A : cystathionine beta – lyase, B : Glutathione reductase, C : Homoserine O acetyl transférase, D : pecate lyase, E : Scytalone déhydratase, F : thioredoxin peroxidase, G : Thioredoxin reductase, H : 3HNR, I : 4HNR).

4. Docking moléculaire

L'amarrage moléculaire est une méthode importante dans le domaine de la conception assistée par ordinateur de médicaments/pesticides. Elle peut être utilisée pour générer des conformations tridimensionnelles (3D) de petites molécules (ligands) liées à une cible macromoléculaire (protéine) ou pour prédire laquelle de ces conformations est la plus proche de celle d'une molécule de référence (**Li et al., 2020**). Une interface AutoDock Vina, est un moteur pour la mise en place de simulation d'amarrage, est également disponible en tant que partie intégrée du programme moléculaire UCSF Chimera (**Di Muzio et al., 2017**).

Le criblage virtuel joue un rôle important dans les processus de découverte de composés antifongiques car il est rapide, rentable et réduit considérablement le nombre de composés à cribler dans les essais in vitro. Dans l'approche de criblage basée sur la structure, des bases de données comprenant des structures chimiques de milliers à des millions de composés sont criblées par rapport aux résidus du site actif d'une protéine cible pour prédire les molécules à bioactivité antifongique, antibactérienne et antiparasitaire (**Gallinger et al., 2022**).

L'identification des conformations et des liaisons les plus probables au sein d'un complexe protéine-ligand nécessite deux étapes : (i) l'exploration d'un grand espace conformationnel représentant divers modes de liaison potentiels ; (ii) une prédiction précise de l'énergie d'interaction associée à chacune des conformations de liaison prédites. Les programmes d'amarrage moléculaire effectuent ces tâches via un processus cyclique, dans lequel la conformation du ligand est évaluée par des fonctions de notation spécifiques. Ce processus est effectué jusqu'à converger vers une solution d'énergie minimale (**Ferreira et al., 2015**).

L'amarrage moléculaire a été effectué en prenant des petites molécules à la fois comme des molécules bioactives produites par les champignons filamenteux et les actinomycètes après une étude bibliographique profonde. Ces molécules ont été ancrées aux sites actifs des protéines modèles étudiées. Diverses énergies d'affinités de liaison sont obtenues pour tous les ligands en termes de (Kcal/mol). Les différentes caractéristiques des affinités de liaison des complexes dockés sont résumés dans les **tableaux 29 et 30**, qui montre le résumé des scores de liaison des produits fongiques et actinomycétales obtenus à partir d'Auto Dock Vina en kcal/mol. Les scores d'énergie négatifs reflètent une forte affinité de liaison entre le récepteur et le ligand. Les poses ancrées avec les plus faibles énergies de liaisons sont celles qui est ont les affinités de liaison les plus élevées avec leurs récepteurs. Les ligands avec les

affinités de liaison les plus faibles ont été sélectionnés pour une étude approfondie de leurs interactions avec leurs récepteurs correspondants. Les fongicides commercialisés (s'ils existent) connus pour leur action inhibitrice contre les enzymes étudiées ont également été amarrés et leurs scores ont été utilisés comme valeurs de références utiles à la comparaison pour les ligands testés. La visualisation des interactions a été réalisées par Discovery Studio.

Tableau 29. Résultat de docking moléculaire donnés en scores d'affinité entre les enzymes modélisées et les ligands fongiques.

Le ligand	cystathionine β -lyase	Glutathione réductase	Homoserine O-acétyl transférase	Pectate lyase	Scytalone déshydratase	Thioredoxine réductase	Thioredoxine peroxydase	4HNR	3HNR
	Le score d'affinité (kcal/mol)								
Pyrimethanil (fongicide)	-5,8	/	/	/	/	/	/	/	/
Cyprodinil (fongicide)	-6,6	/	-6,3	/	/	/	/	/	/
mepanipirim (fongicide)	-6,1	/	/	/	/	/	/	/	/
Carbendazim (fongicide)	/	-7,4	/	/	/	/	/	/	/
Carpropamid (fongicide)	/	/	/	/	-8,9	/	/	/	/
Pyroquillon (fongicide)	/	/	/	/	/	/	/	-6,8	-3,3
Tricyclazole (fongicide)	/	/	/	/	/	/	/	-6,7	-3,1
4-nitro - inden-1- one (fongicide)	/	/	/	/	/	/	/	/	-6,5
Phthalide (fongicide)	/	/	/	/	/	/	/	/	-5,3
Altersolanol A	-6,8	-8,4	+37,4	-5,9	-5,9	-6,5	+25,7	-8,9	+14,4
Bassianin	-7,5	-7,3	+22,3	-4,7	-4,1	-8,8	+34,0	-8,9	+76,6
Bulnesene	-4,1	-5,8	+16,4	-5,2	-8,6	-5,9	+16,9	-7,0	-1,8
Camptothecin	-7,0	-9,2	+31,6	-5,5	-9,7	-6,5	+39,7	-10,5	+90
Caryophyllene	-4,2	-5,0	+23,9	-5,3	-7,9	-5,6	+17,1	-7,0	-0,5
Cerinolactone	-5,8	-8,0	+25,3	-6,0	-8,8	-6,6	+27,4	-8,7	+31
Compactin	-5,3	-5,7	+33,8	-5,1	-7,2	-7,6	+34,4	-8,9	+14,5
Cremenolide	-4,8	-6,2	+31,2	-5,3	-8,4	-6,2	+37,6	-8,2	+4,3
Diosgenin	-5,1	-3,7	+87,3	-5,1	+11,4	-6,9	+155,4	-9,9	+11,8
8-O-di methylaverufin	-7,0	-6,0	+54,3	-4,4	-4,3	-7,1	+102,3	-10,7	+5,8
Acide eicosanoïque	-5,5	-5,8	+5,6	-3,8	-6,7	-5,7	-0,2	-5,9	+1,5
Emodin	-6,3	-8,0	+29,8	-6,7	-7,1	-6,6	+3,0	-9,0	+21,3
Ergosterol	-5,9	-3,3	+54,7	-5,2	-4,7	-6,3	+81,7	-9,8	+54,4
Fumagillin	-6,8	-7,1	+27,5	-5,0	-5,9	-7,3	+64,9	-9,7	+49,9
Acide fusidique	-4,3	+4,3	+79,0	+4,4	+4,7	-4,4	+148,2	-10,0	+100,2
Fusapyrone	-5,7	-7,0	+34,6	-1,7	-0,8	-7,9	+87,9	-8,9	+90,8
Gibberellins	-4,7	-5,3	+40	-6,8	-8,0	-5,6	+61,6	-9,5	+19,5
Acide gibberellique	-5,1	-7,6	+39,7	-7,2	-7,2	-5,7	+60,5	-8,3	+15,4
Griseofulvin	-5,2	-5,6	+42,6	-5,5	-9,0	-5,3	+50,4	-7,2	+18
Harzianolide	-5,7	-6,1	+6,6	-5,5	-7,7	-6,3	+3,6	-7,0	-0,7
Acide heptelidique	-5,6	-6,5	+27	-6,0	-7,7	-6,5	+24,7	-8,4	+5,4
Huperzine A	-5,7	-7,4	+26,9	-6,1	-9,2	-7,7	+42,8	-8,1	+5,6
Hypericin	-5,5	+0,3	+96	+8,8	+21,2	-5,4	+177,0	+14,6	+15,2
Javanicin	-6,5	-7,4	+24,2	-5,5	-6,8	-7,0	+8,0	-8,1	+7,6
Acide kojique	-4,9	-5,8	-1,3	-4,4	-4,9	-5,8	-3,4	-5,2	-4,4
Lovastatine	-5,4	-5,6	+37,8	-5,1	-8,0	-7,8	+50,8	-8,7	+24,7
8-O-methylaverufin	-6,5	-5,8	+54,3	-3,8	-7,5	-7,0	+71,7	-10,4	+99,2
6-O methyl alaternin	-6,4	-8,3	+30,8	-6,1	-7,1	-6,9	+10,4	-9,2	+11,8
8-O-méthylsclerotiorinamine	-5,7	-5,7	+32,8	-5,3	-3,2	-5,9	+45,8	-8,4	+12,3
Mevinlon	-5,5	-4,5	+37,9	-5,4	-8,3	-7,8	+62,7	-8,8	+16,9
Mizoribine	-5,9	-7,4	+11,8	-5,5	-6,1	-6,8	+3,5	-7,2	+0,2
Monascorubramine	-5,8	-2,6	+36,8	-2,9	-5,5	-5,7	+91,3	-8,7	+13,5
Acide mycophénolique	-6,3	-6,5	+18,3	-5,4	-8,4	-5,9	+26,9	-7,7	+8,0

Nigerasperone A	-5,5	-5,6	+32,5	-6,0	-8,2	-6,8	+14,6	-7,0	+9,7
Penicillin V	-6,3	-6,3	+19,6	-5,7	-7,3	-7,1	+32,9	-8,5	+17,7
Pestalachloride	-5,0	-4,8	+52,1	-6,0	-7,3	-4,8	+35,3	-6,2	+30
phenylethyl alcool	-4,1	-5,0	-2,5	-4,4	-5,9	-5,0	-2,9	-5,0	-5,2
2- phenylethyl ester	-6,0	-6,4	+3,9	-4,7	-7,4	-6,2	-0,2	-5,9	-3,2
P-hydroxybenzaldehyde	-4,8	-5,3	-2,0	-4,3	-5,7	-5,3	-3,6	-4,9	-5,0
Podophyllotoxin	-5,8	-6,0	+49,7	-4,1	-5,5	-5,2	+36,0	-5,9	+54,8
Pravastatin	-4,9	-5,0	+23,9	-5,0	-7,3	-7,0	+37,8	-7,8	+12,4
Acide propanoïque	-3,2	-3,5	-4,1	-3,2	-3,7	-3,4	-3,2	-3,3	-3,5
Radicol	-5,8	-6,1	+56,3	-6,1	-5,9	-6,7	+89,0	-8,9	+37,7
Resveratrol	-5,7	-7,3	+15,9	-5,0	-8,1	-6,8	+8,7	-8,1	+11,4
Sordacirin	-4,1	-4,3	+41	-6,0	-7,1	-4,9	+67,5	-6,7	+13,2
Sydowinin A	-6,8	-7,3	+24,5	-6,1	-8,0	-6,3	+15,7	-8,8	+6,9
Tenellin	-7,6	-7,3	+23,9	-4,8	-7,8	-6,2	+28,3	-8,9	+17,9
Terpenoid	-6,1	-6,1	+36,9	-4,8	-4,8	-5,4	+57,3	-8,9	+32,6
Tyrosol	-4,6	-5,5	-1,4	-4,5	-5,8	-5,3	-4,0	-5,3	-5,1
Xanthone	-6,4	-7,0	+16,4	-6,2	-8,3	-6,9	-3,9	-7,4	-3,7
α -Zearalanol	-5,7	-5,9	+48,2	-6,0	-4,8	-5,2	+63,0	-6,5	+18,7


 Le score d'affinité le plus faible

Tableau 30. Résultat de docking moléculaire donnés en scores d'affinité entre les enzymes modélisées et les ligands actinomycétales.

Le ligand	cystathionine β - lyase	Glutathione réductase	Homoserine O-acétyl transférase	Pectate lyase	Seytalone déhydratase	Thioredoxine réductase	Thioredoxine peroxydase	4HNR	3HNR
	Le score d'affinité (kcal/mol)								
Anthraquinones	-7,7	-7,6	+30,9	-6,5	-8,1	-6,4	+13,4	-9,2	+2,3
Antimycin	-5,1	-6,4	+20,2	-6,7	-8,1	-6,8	+17,3	-7,7	-1,4
D-Arabinofuranosyladénine	-6,4	7,3	+18,5	-5,5	-6,6	-6,9	+7,4	-7,4	-3,6
Azalomycin	-5,7	-3,9	+57,4	-6,8	-3,1	-6,5	+99,4	-7,4	+22,7
Bestatin	-5,8	-6,8	+9,2	-5,4	-7,8	-7,3	+6,8	-7,8	-0,7
Blasticidin	-6,4	-6,5	+25,5	-3,1	-4,4	-6,7	+33,6	-8,8	+9,5
Borrelidine	-4,0	+14,3	+90,6	+4,9	+15,6	-6,2	+154,3	+6,8	+58,7
Chloramphenicol	-5,8	-7,2	+11,7	-5,3	-7,9	-6,6	+10,0	-7,2	-0,4
Cycloheximide	-6,9	-7,6	+19,4	-6,1	-8,8	-7,4	+9,7	-8,5	+1,0
Cycloserine	-3,7	-4,5	-2,2	-4,0	-3,8	-4,4	-3,4	-4,0	-3,7
Daunorubicin (daunomycin)	-6,3	+1,8	+65,4	-1,6	+4,3	-6,3	+107,5	-9,8	+45,3
Diazepinomicin	-7,5	+1,0	+35,5	-5,3	-6,1	-7,8	+76,2	-9,1	+19,3
Doxorubicin (adriamycin)	-5,9	-2,1	+62,5	-1,8	+3,8	-5,7	+88,7	-9,8	+43,1
Fungichromin	+0,2	+14,1	+112,5	76,2	+92,4	-3,3	+150,9	-4,5	+56,3
Galbonolides	-4,6	+1,4	+57,0	-4,9	+2,1	-5,1	+91,8	-2,5	+23,8
Gentamicin	-6,4	-6,3	+34,1	-4,5	-1,8	-5,3	+56,8	-8,2	+100,5
Herbimycin	-4,2	+18,8	+104	24,5	+21,1	-3,6	+157,1	+6,8	+82,0
8-Hydroxyquinoline	-5,6	-6,1	+1,6	-5,4	-6,6	-5,5	-3,4	-5,7	-5,0
Hygromycin	-7,3	-5,4	+46,4	-1,8	+25,3	-8,1	+84,8	-	+164,4

								10,2	
Acide Indole-3-carboxylique	-5,6	-6,1	+1,4	-5,3	-6,7	-6,0	-3,2	-6,1	-6,1
Jadomycin	-6,9	-5,6	+68	-5,0	-1,0	-5,2	+80,9	-1,3	+29,4
Kanamycin	-6,2	-6,7	+32,6	-5,0	-2,8	-6,6	+61,9	-8,5	+22,3
Kasugamycin	-5,9	-7,1	+24,7	-5,8	-7,0	-7,2	+38,8	-8,2	+5,6
Kifunensine FR-900494	-5,8	-7,0	+11,9	-5,8	-5,9	-6,3	+10,4	-6,8	-1,7
Kitamycin	-5,9	-6,4	+44,1	-4,5	-2,9	-5,5	+74,9	-9,3	+30,0
Lincomycin	-5,1	-6,7	+24,2	-4,5	-6,1	-6,5	+53,9	-7,7	+10,0
Lomofungin	-7,0	-7,3	+23,5	-6,3	-7,4	-7,5	+16,9	-9,1	+1,8
Lupinacidin	-6,9	-7,0	+34,3	-5,8	-8,6	-6,6	+45,6	-8,9	+11,3
Nikkomycin	-6,6	-7,4	+32,0	-5,5	-4,9	-7,4	+55,8	-9,6	+15,0
Oxytetracycline	-6,4	-2,1	+59,0	-2,7	-0,9	-5,5	+108,4	-8,9	+38,3
Panosialins	-6,4	-5,3	+16,7	-4,3	-8,0	-6,8	+27,5	-8,1	+8,9
Pentalenolactone	-5,8	-6,4	+26,6	-6,0	-9,2	-6,8	+28,7	-7,7	+4,1
Phenylacetate	-5,4	-5,6	-2,1	-4,3	-6,5	-5,3	-4,4	-5,3	-5,3
Acide 3-Phenylpropionique	-4,8	-5,8	-1,1	-4,9	-6,4	-5,8	-3,8	-5,6	-5,4
Polyoxin B	-6,3	-8,3	+22,8	-4,3	-5,4	-8,5	+39,5	-9,2	+70,6
Prodiginine	-0,9	-1,0	-1,2	-0,8	-1,1	-1,1	-0,8	-1,0	-1,0
Resistomycin	-6,0	-5,9	+51,5	-5,5	-4,0	-5,4	+95,3	-5,9	+17,0
Rosamicin	-3,8	+9,2	+105,7	+7,8	+14,6	-4,2	+160,7	+1,9	+49,7
Roseoflavin	-5,6	-6,7	+32,8	-4,8	-6,8	-5,0	+44,6	-6,9	+11,4
Salinosporamide	-5,6	-7,1	+22,4	-5,2	-8,1	-6,7	+9,0	-8,0	+3,0
Spinosyn	-4,2	+2,9	+100,7	+4,2	+11,2	-6,7	+155,5	-9,4	+73,6
Streptokordin	-5,1	-5,7	+1,8	-4,7	-6,9	-5,7	-3,0	-5,7	-6,1
Streptolydigin	-6,5	+2,2	+68,4	+5,0	+8,2	-6,8	+140,3	-9,3	+54,9
Streptomycin	-5,7	-2,0	+51,0	-3,5	-0,7	-4,9	+72,6	-6,8	+97,3
Streptothricin	-5,8	-7,4	+33,3	-3,8	-1,8	-6,5	+61,6	-8,6	+78,6
Tetracenomycin	-6,2	-4,6	+51,0	-3,0	+3,3	-5,1	+110,4	-8,6	+55,8
Tetracycline	-7,2	-1,9	+59,8	-2,0	-1,9	-5,4	+100,1	-9,7	+34,7
Transvalencin	-6,4	-8,4	+12,9	-5,8	-7,8	-8,1	+6,3	-7,7	+4,6
Validamycin	-6,2	-6,6	+36,9	-5,4	-3,3	-6,3	+58,4	-9,0	+20,7

Le score d'affinité le plus faible

Pour l'enzyme modélisée cystathionine β lyase, les scores de liaison des trois fongicides commerciaux : Pyrimethanil, Cyprodinil et Mepanipyrim sont -5.8, -6.6 et -6.1 Kcal/mol, respectivement (**Tableau 29**). Cependant, pour les métabolites secondaires fongiques, seuls 7 ligands ont montré des scores d'affinité inférieurs à ceux des fongicides ; ces métabolites sont l'altersolanol A, Bassianin, Camptothecin, 8-O-di methylaverufin, Fumagillin, Sydowinin A et Tenellin (-6.8, -7.5, -7.0, -7.0, -6.8, -6.8 et -7.6 Kcal/mol, respectivement). Dans le cas des métabolites actinomycétales, les 5 ligands sont Anthraquinones, Diazepinomicin, Hygromycin, Lomofungin et Tetracycline ont données des scores d'affinité inférieurs aux molécules de références. Ces scores sont dans l'ordre -7.7, -7.5, -7.3, -7.0 et -7.2 Kcal/mol, respectivement (**Tableau 30**).

Pour la glutathione réductase, le score d'affinité du fongicide de référence carbendazim est de -7.4 Kcal/mol. Pour les ligands fongiques, seulement 6 ligands ont montré des scores d'affinité inférieurs à celui du fongicide de référence. Ces molécules sont l'altersolanol A, Camptothecin, Cerinolactone, Emodin, acide Gibberellique, 6-O methyl alaternin (-8.4, -9.2, -8.0, -8.0, -7.6 et -8.3 Kcal/mol, respectivement) (**Tableau 29**). En ce qui concerne les métabolites d'origine actinomycétale, les 6 ligands Anthraquinones, Cycloheximide, Nikkomycin, Polyoxin B, Streptothricin et Transvalencin ont montré les résultats les plus prometteurs avec des scores de liaison de -7.6, -7.6, -7.4, -8.3, -7.4 et -8.4 Kcal/mol, respectivement.

Pour l'homoserine O-acétyltransférase, le fongicide Cyprodinil a donné un score de -6.3 Kcal/mol. Pour les deux groupes de métabolites fongiques et actinomycétales, aucune molécule n'a donné une énergie de liaison inférieure ou même proche de celui de la molécule de référence, donc aucune molécule n'est considérée comme ayant une possible activité antifongique contre cette enzyme.

Pour le scytalone déshydratase, le fongicide de référence Carpropamid a montré une énergie de liaison de -8,9 Kcal/mol. Trois molécules fongiques ayant des énergies de liaison inférieures à la référence ont été prise en considération ; Camptothecin, Griseofulyin et Huperzine A (-9.7, -9.0, -9.2 Kcal/mol, respectivement). Alors qu'un seul ligand d'origine actinomycétale qui est le Pentalenolactone dont leur score est -9,2 Kcal/mol a été sélectionné (**Tableau 30**).

Pour le 4HNR, les fongicides Pyroquillon et Tricyclazole ont montré des énergies de liaison de -6,8 et -6,7 Kcal/mol respectivement. Pour les ligands fongiques, 39 molécules

ont donnés des scores d'affinité inférieurs à ceux des molécules de référence ; ces molécules sont altersolanol A, Bassianin, Bulnesene, Camptothecin, Caryophyllene, Cerinolactone, Compactin, Cremenolide, Diosgenin, 8-O-di methylaverufin, Emodin, Ergosterol, Fumagillin, Fusidic acid, Fusapyrone, Gibberellins, Gibberellic acid, Griseofulvin, Harzianolide, heptelidic acid, Huperzine A, Javanicin, Lovastatine, 8-O-methylaverufin, 6-O methyl alaternin, 8-O-méthylsclererotiorinamine, Mevinlon, Mizoribine, Monascorubramine, Mycophenolic acid, Nigerasperone A, Penicillin V, Pravastatin, Radicol, Resveratrol, Sydowinin A, Tenellin, Terpenoid, Xanthone (-8.9, -8.9, -7.0, -10.5, -7.0, -8.7, -8.9, -8.2, -9.9, -10.7, -9.0, -9.8, -9.7, -10.0, -8.9, -9.5, -8.3, -7.2, -7.0, -8.4, -8.1, -8.1, -8.7, -10.4, -9.2, -8.4, -8.8, -7.2, -8.7, -7.7, -7.0, -8.5, -7.8, -8.9, -8.1, -8.8, -8.9, -8.9, -7.4, Kcal/mol, respectivement). Alors que 32 ligands actinomycétales : Anthraquinones, Antimycin, D-Arabinofuranosyladénine, Azalomycin, Bestatin, Blastocidin, Chloramphenicol, Cycloheximide, Daunorubicin, Diazepinomicin, Doxorubicin, Gentamicin, Hygromycin, Kanamycin, Kasugamycin, Kitamycin, Lincomycin, Lomofungin, Lupinacidin, Nikkomycin, Oxytetracycline, Panosialins, Pentalenolactone, Polyoxin B, Salinosporamide, Spinosyn, Streptolydigin, Streptothricin, Tetracenomycin, Tetracycline, Transvalencin, et Validamycin ont montré des scores intéressants par rapport aux références qui sont dans l'ordre -9.2, -7.7, -7.4, -7.4, -7.8, -8.8, -7.2, -8.5, -9.8, -9.1, -9.8, -8.2, -10.2, -8.5, -8.2, -9.3, -7.7, -9.1, -8.9, -9.6, -8.9, -8.1, -7.7, -9.2, -8.0, -9.4, -9.3, -8.6, -8.6, -9.7, -7.7, -9.0 Kcal/mol (**Tableau 30**).

Pour 3HNR, on trouve le score d'affinité des quatres fongicides : Pyroquillon, Tricyclazole, 4-nitro-inden-1-one, Phthalide est -3.3, -3.1, -6.5 et -5.3 Kcal/mol (respectivement). Cependant, pour les ligands fongiques on a trouvé seuls 3 ligands fongiques qui ont un score d'affinité inférieur à celle de fongicides qui sont Phenylethyl alcool, P-hydroxybenzaldehyde et Tyrosol (-5.2, -5.0 et -5.1 Kcal/mol) et 5 ligands actinomycétales qui sont 8-Hydroxyquinoline, Indole-3-carboxylic acid, Phenylacetate, 3-Phenylpropionic acid et Streptokordin (-5.0, -6.1, -5.3, -5.4, -6.1 Kcal/mol) respectivement.

Pour les trois enzymes pecate lyase et thioredoxin réductase et thioredoxin peroxidase aucun fongicide chimique connu n'est destiné contre l'activité de ces trois enzymes. A notre connaissance, il n'existe aucune étude axée sur la recherche d'inhibiteurs potentiels pour ces enzymes du phytopathogène *Alternaria* ; notre étude est donc la première investigation sur la recherche de nouveaux biofongicides ciblant ces trois enzymes chez ce champignon phytopathogène. Comme aucune molécule inhibitrice n'est disponible pour servir de référence de score de liaison, les métabolites avec les énergies de liaison les plus faibles ont été

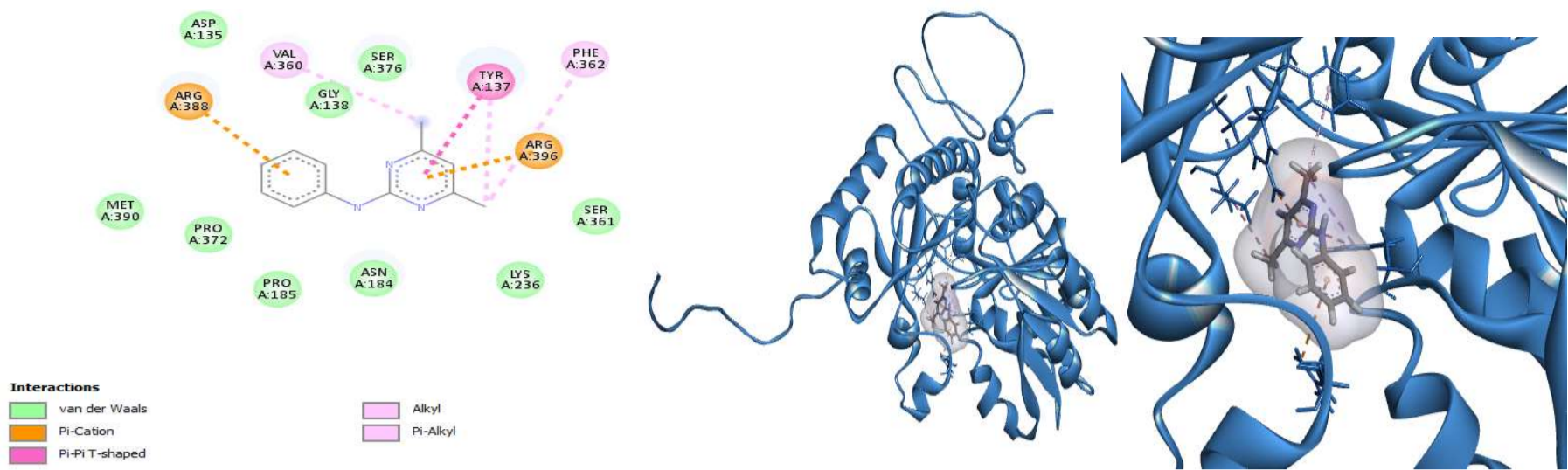
sélectionnée et considérés comme ayant une possible action inhibitrice contre ces nouvelles cibles enzymatiques. Dans la catégorie des métabolite fongiques, les quatre ligands Emodin, Gibberllins, acide Gibberellique et Xanthone avec des scores de -6.7, -6.8, -7.2, -6.2 Kcal/mol, respectivement ont été sélectionné pour la pecate lyase. La Bassianin, Fusapyrone, Huperzine A, Lovastatine, Mevinlon (-8.8, -7.9, -7.7, -7.8, -7.8 Kcal/mol, respectivement) ont été sélectionné pour la thioredoxin réductase. L'acide kojique, P-hydroxybenzaldehyde, acide propionique, Tyrosol, Xanthone (-3.4, -3.6, -3.2, -4.0, -3.9 Kcal/mol, respectivement) ont été sélectionné pour thioredoxin peroxidase. De l'autre côté, pour la catégorie des métabolites actinomycétales, l'Anthraquinones, Antimycin, Azalomycin et Lomofungin dont leur score -6.5, -6.7, -6.8, -6.3 kcal/mol respectivement ont été pris pour la pecate lyase. La Diazepinomicin, Hygromycin, Lomofungin, Polyoxin B et Transvalencin (-7.8, -8.1, -7.5, -8.5 et -8.1 Kcal/mol respectivement) ont été pris pour thioredoxin réductase. La Cycloserine, 8-Hydroxyquinoline, Indole-3-carboxylic acid et Phenylacetate et 3-Phenylpropionic acid (-3.4, -3.4, -3.2, -4.4, -3.8 Kcal/mol, respectivement) ont été sélectionné pour la thioredoxin peroxidase.

5. Visualisation des interactions des complexes prometteurs récepteur-ligand

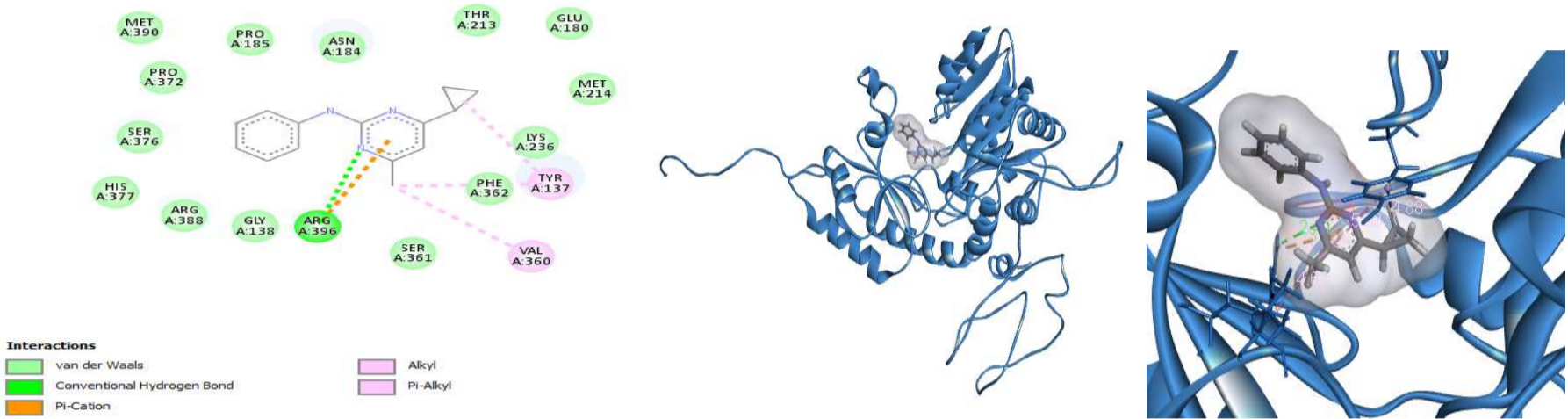
L'étape de la visualisation des interactions a été effectuée en choisissant les complexes récepteur-ligand ayant les plus faibles énergies de liaison dans le processus de docking moléculaire afin de déterminer les différentes interactions établies au sein de ces complexes. Cette étape a été effectuée à l'aide de Discovery Studio.

Les représentations 2D et 3D des interactions entre les enzymes étudiées et leurs inhibiteurs potentiels sont illustrées dans les figures ci-dessous (50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, et 57) ainsi que les tableaux 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, et 38. Les interactions recherchées sont principalement les liaisons d'hydrogène qui représentent les liens les plus important vu la solidité qu'elles confèrent à la connexion entre deux atomes. Les interactions hydrophobes sont également parmi les liens solidifiant la stabilité des complexes protéines-ligand. Parmi ces liaisons l'interaction en forme de T pi-pi implique une interaction du nuage d'électrons pi entre deux groupes aromatiques en forme de T (c'est-à-dire le nuage d'électrons latéral d'un anneau et le nuage d'électrons frontal d'autres anneaux). Dans les interactions pi-alkyle, il y a une interaction sur un groupe aromatique et un groupe d'électrons Pi de tout groupe d'alkyle (Mousavi *et al.*, 2021).

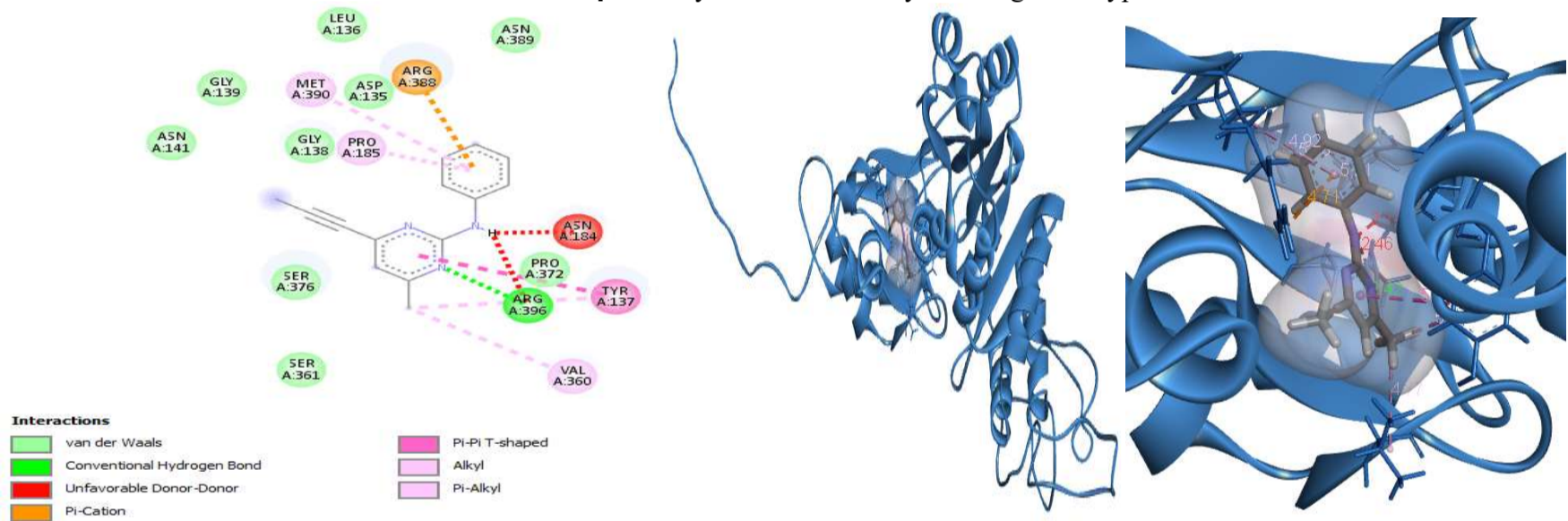
Pour le cystathionine beta-lyase nous avons choisi les ligands fongiques (Bassianin, Camptothecin, 8-O-di methylaverufin et Tenellin) et les ligands actinomycétales (Anthraquinones, Diazepinomicin, Hygromycin, Lomofungin et Tetracycline) (Figure 50, Tableau 31).



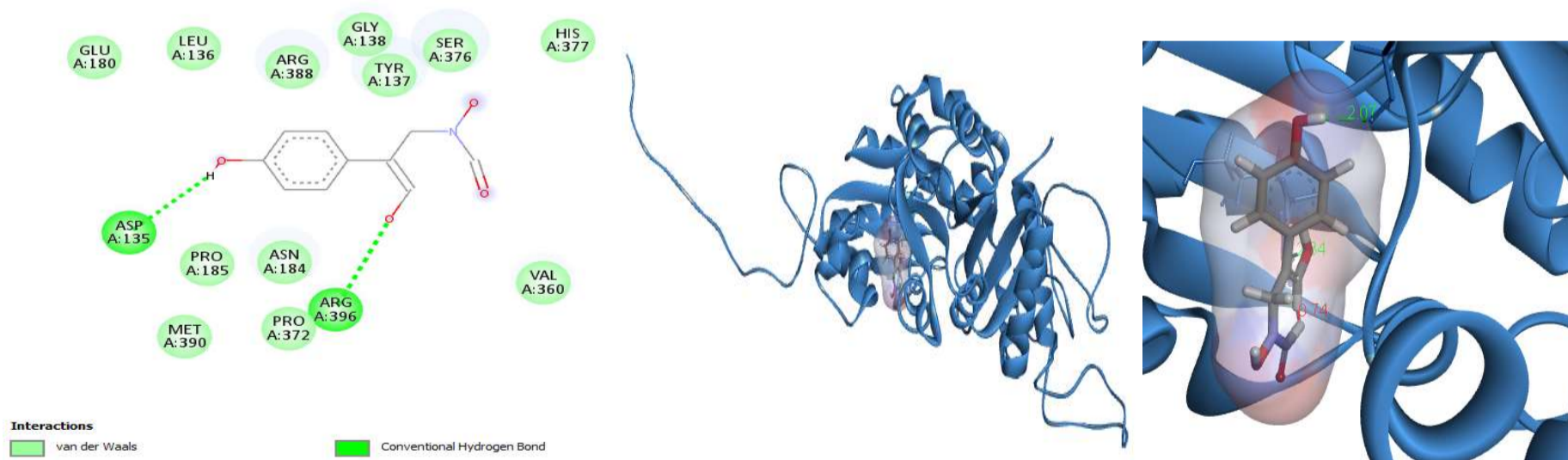
Complexe : cystathionine beta lyase- fongicide Pyrimethanil



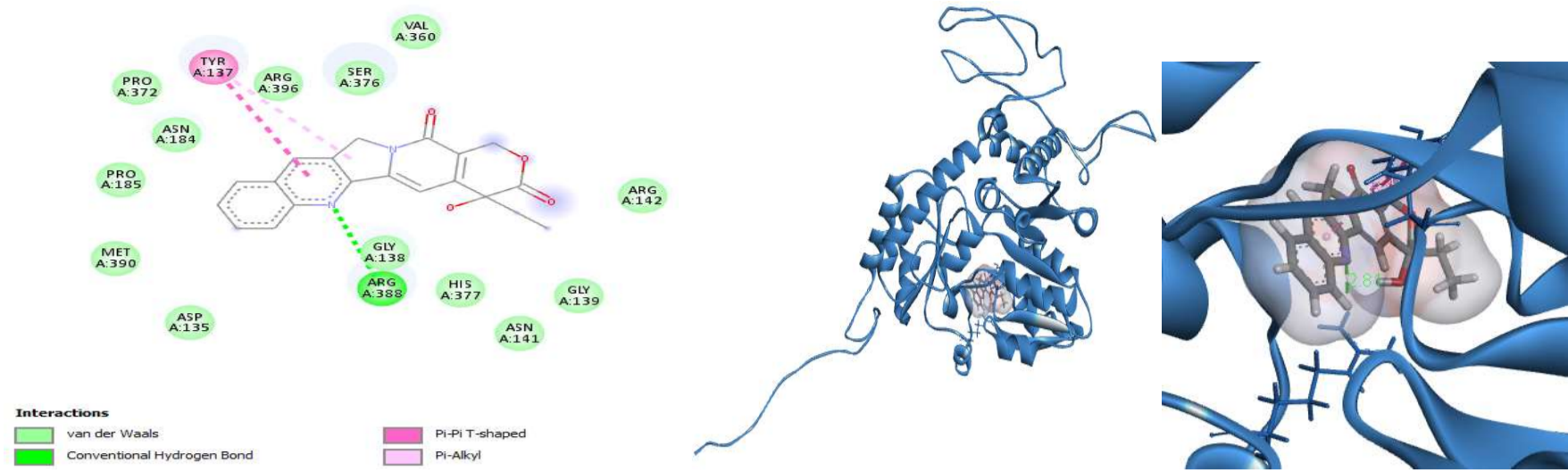
Complexe : cystathionine beta lyase- fongicide Cyprodinil



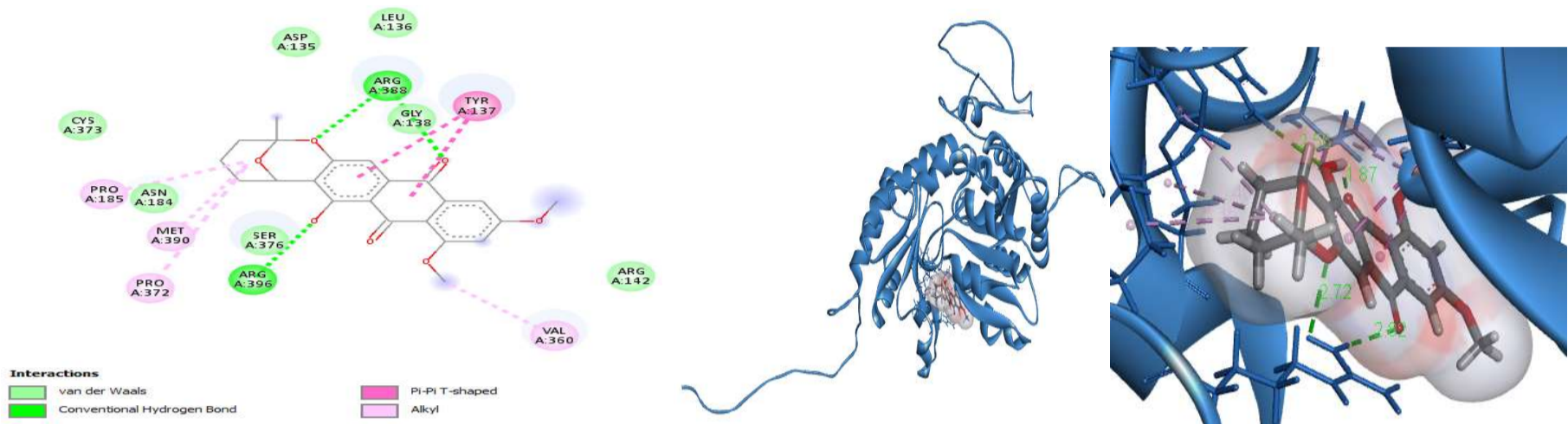
Complexe : cystathionine beta lyase- fongicide Mepanipyrim



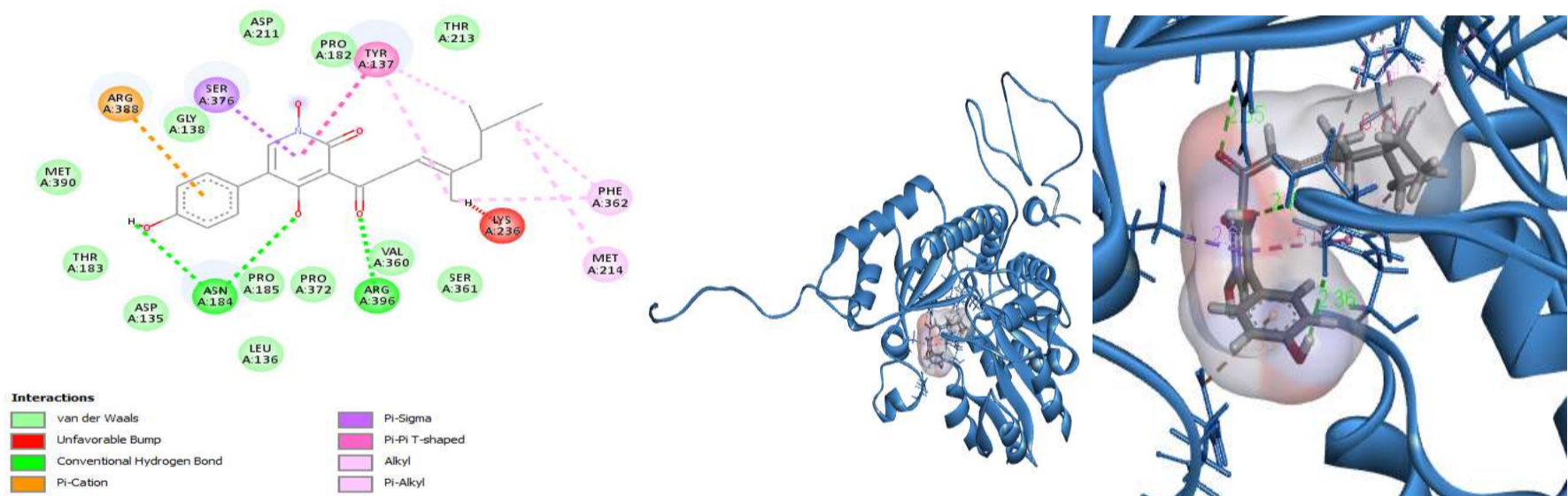
Complexe : cystathionine beta lyase- ligand Bassianin



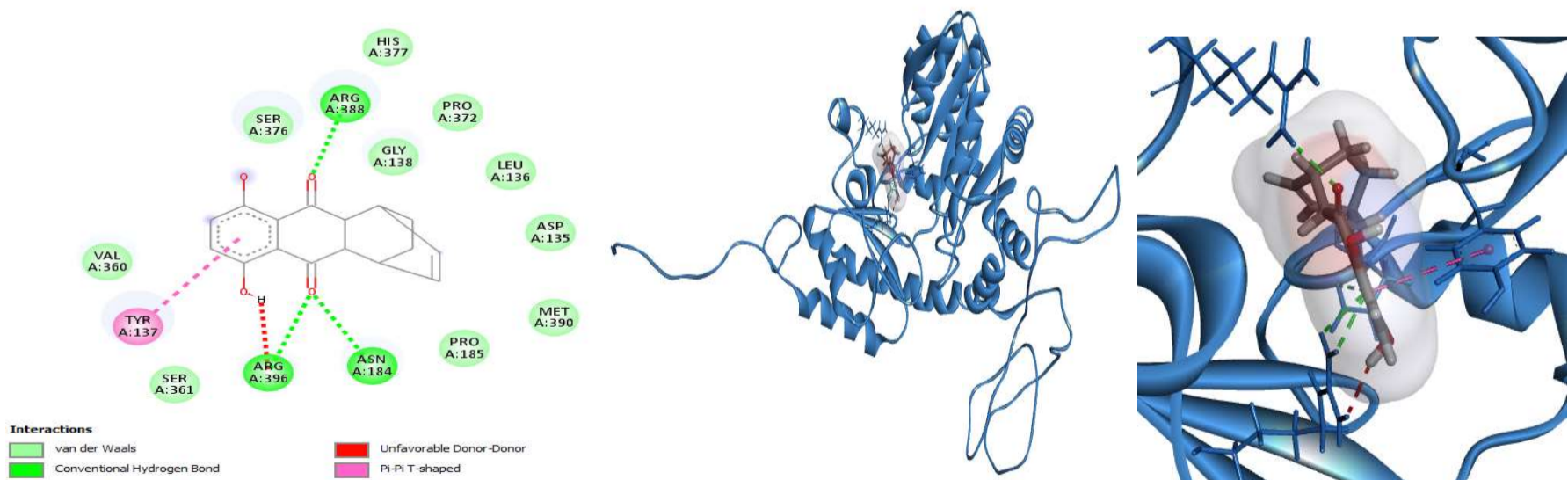
Complexe : cystathionine beta lyase- ligand Camptothecin



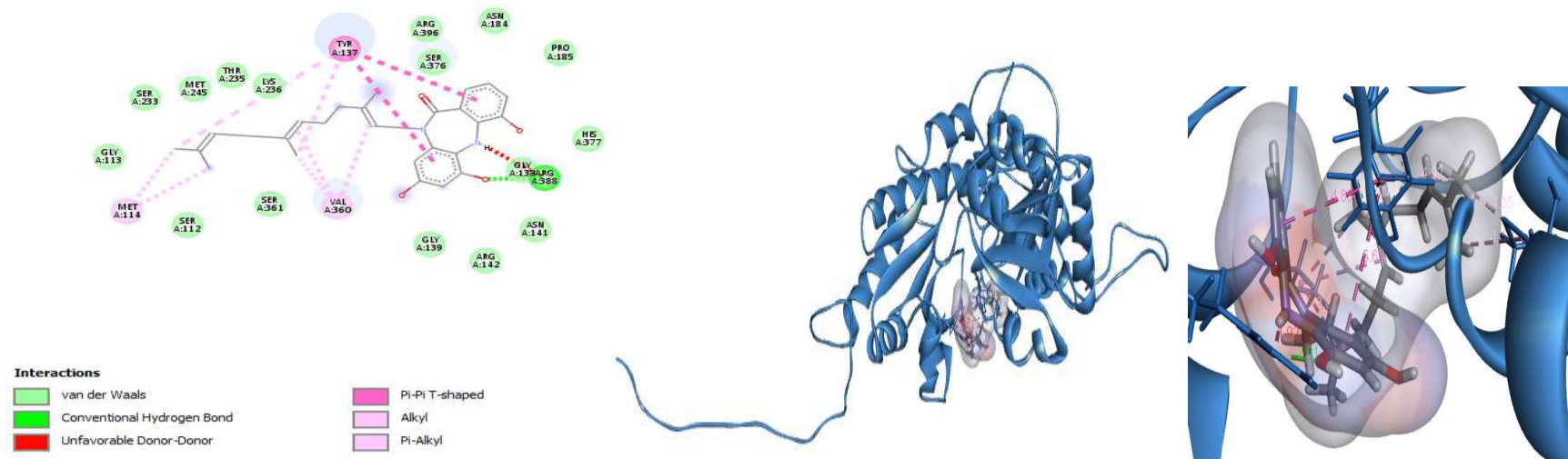
Complexe : cystathionine beta lyase- ligand 8-O-di methylaverufin



Complexe : cystathionine beta lyase- ligand Tenellin



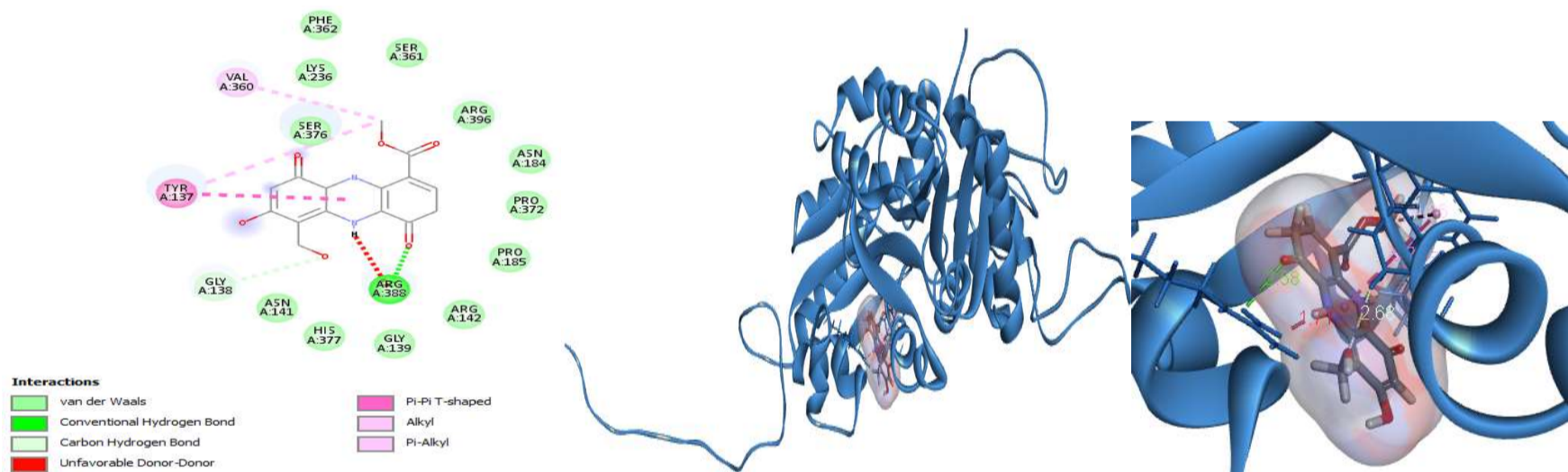
Complexe : cystathionine beta lyase- ligand Anthraquinones



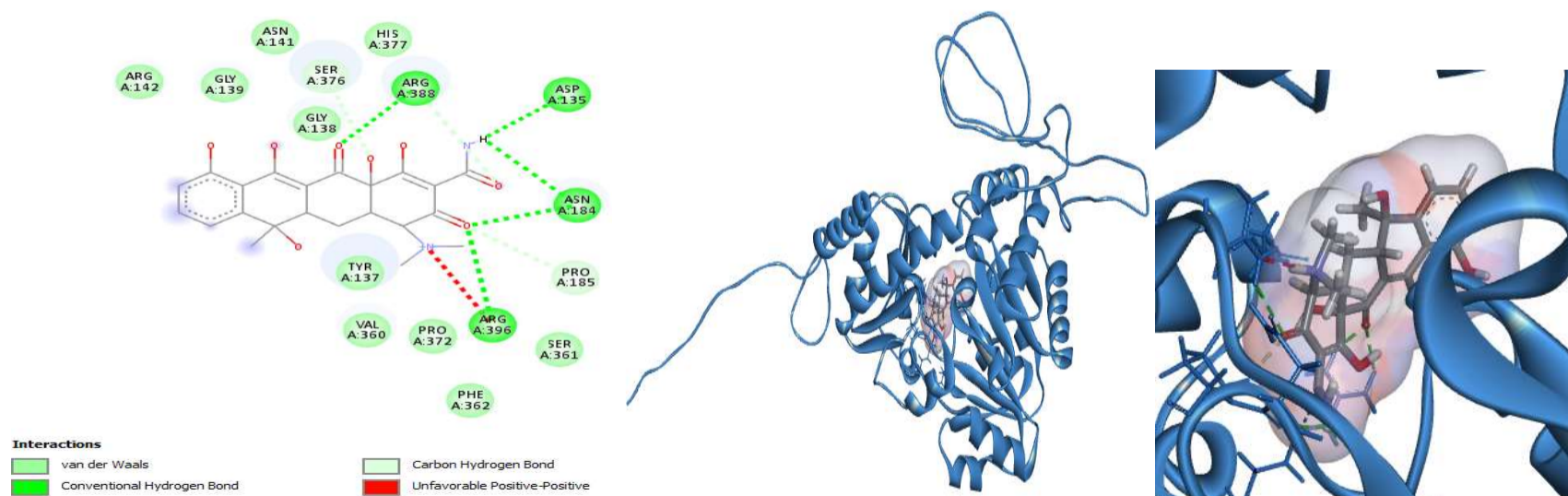
Complexe : cystathionine beta lyase- ligand Diazepinomicin



Complexe : cystathionine beta lyase- ligand Hygromycin



Complexe : cystathionine beta lyase- ligand Lomofungin



Complexe : cystathionine beta lyase- ligand Tetracycline

Figure 50. Illustration 2D et 3D des interactions entre la cystathionine beta lyase et ses meilleurs ligands

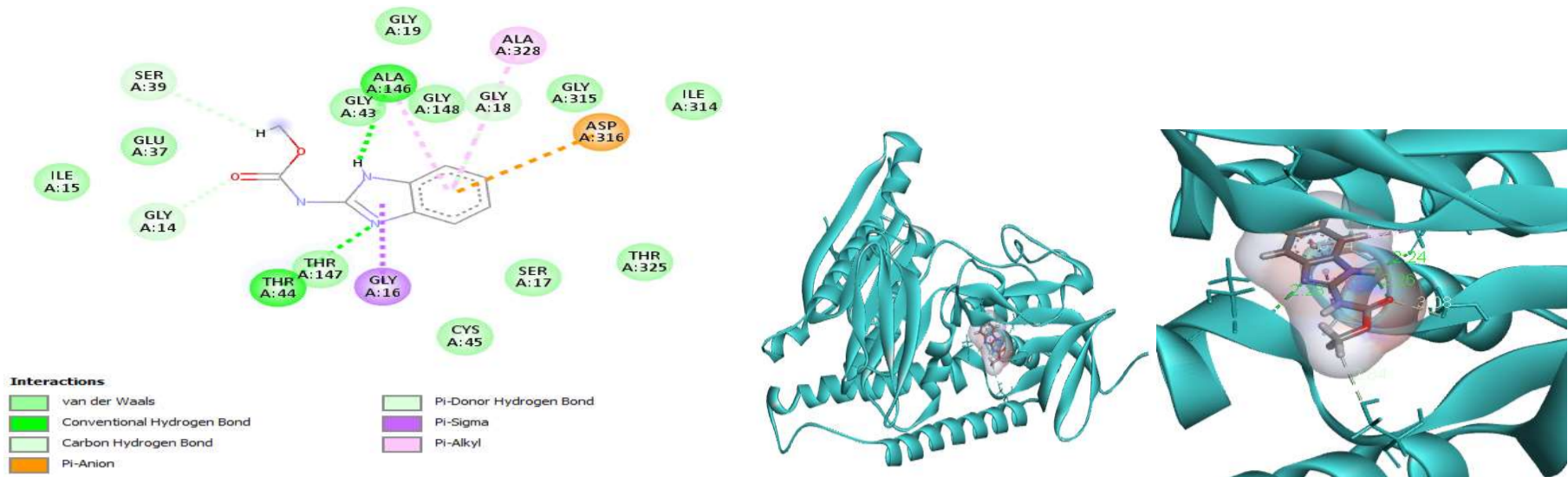
Tableau 31. Types d'interactions entre le récepteur cystathionine beta lyase et les meilleurs ligands fongiques et actinomycétales.

Ligand	Interaction hydrogène	Interaction hydrophobique	Interaction électrostatique	Interaction Van Der waals	
Fongicide	Pyrimethanil	/	Phe362, Tyr137, Tyr137, Val360	Arg396, Arg388	Ser361, Lys236, Asn184, Pro185, Pro372, Met390, Ser376, Gly138, Asp135
	Cyprodinil	Arg396	Val360, Tyr137, Tyr137	Arg396	Thr213, Asn184, Pro185, Pro372, Arg388, Ser376, His377, Gly138, Ser361, Lys236, Phe362, Glu180, Met390, Met214
	mepanipyrim	Arg396	Val360, Tyr137, Tyr137, Pro185, Met390	Arg388	Asp135, Pro372, Ser361, Ser376, Gly138, Gly139, Asn141, Asn389, Leu136
Champignons	Bassianin	Arg396, Asp135	/	/	Arg388, Gly138, Tyr137, Ser376, Val360, Pro372, Asn184, Pro185, His377, Met390, Glu180, Leu136
	Camptothecin	Arg388	Tyr137, Tyr137	/	Val360, Arg396, Asn184, Pro372, Pro185, Ser376, Gly138, Gly139, Asn141, Arg142, His377, Met390, Asp135
	8-O-di methylaverufin	Arg396, Arg388, Arg388	Pro185, Val360, Met390, Pro372, Tyr137, Tyr137	/	Asn184, Ser376, Asp135, Gly138, Leu136, Cys373, Arg142
	Tenellin	Arg396, Asn184, Asn184	Met214, Phe362, Phe362, Tyr137, Tyra37, Tyr137, Ser376	Arg388	Thr213, Lys236, Gly138, Met390, Thr183, Asp135, Pro185, Pro372, Val360, Ser361, Pro182, Asp211, Leu136
Actinomycètes	Anthraquinone s	Gly138, Arg388, Asn184, Arg396	Tyr137	/	Ser376, Val360, Ser371, His377, Asp135, Leu136, Pro185, Met390, Gly138, Pro372
	Diazepinomicin	Arg388	Tyr137, Tyr137, Tyr137, Val360, Val360, Val360, Met114, Met114, Tyr137	/	Gly113, Ser233, Thr235, Arg142, Ser361, Gly139, Asn141, Gly138, His377, Asn184, Ser376, Arg396, Met245, Lys236, Pro185, Ser112
	Hygromycin	Arg388, Arg396, Asn184, Lys236	Val360, Tyr137	/	Met245, Thr235, Ser233, Gly113, Met114, Gly139, Asn141, Gly138, Ser376, Leu136, Asp135, Pro185, Pro372, Ser361, Ser112, Met390
	Lomofungin	Arg388, Gly138	Tyr137, Tyr137, Val360	/	Ser376, Ser361, Lys236, Arg396, Asn184, Pro372, Pro185, Arg142, Asn141, Gly139, Phe362, His377
	Tetracycline	Ser376, Arg388, Arg388, Asp135, Asn184, Asn184, Arg396, Pro185	/	/	Tyr137, Pro372, Val360, His377, Gly138, Asn141, Gly139, Arg142, Phe362, Ser361

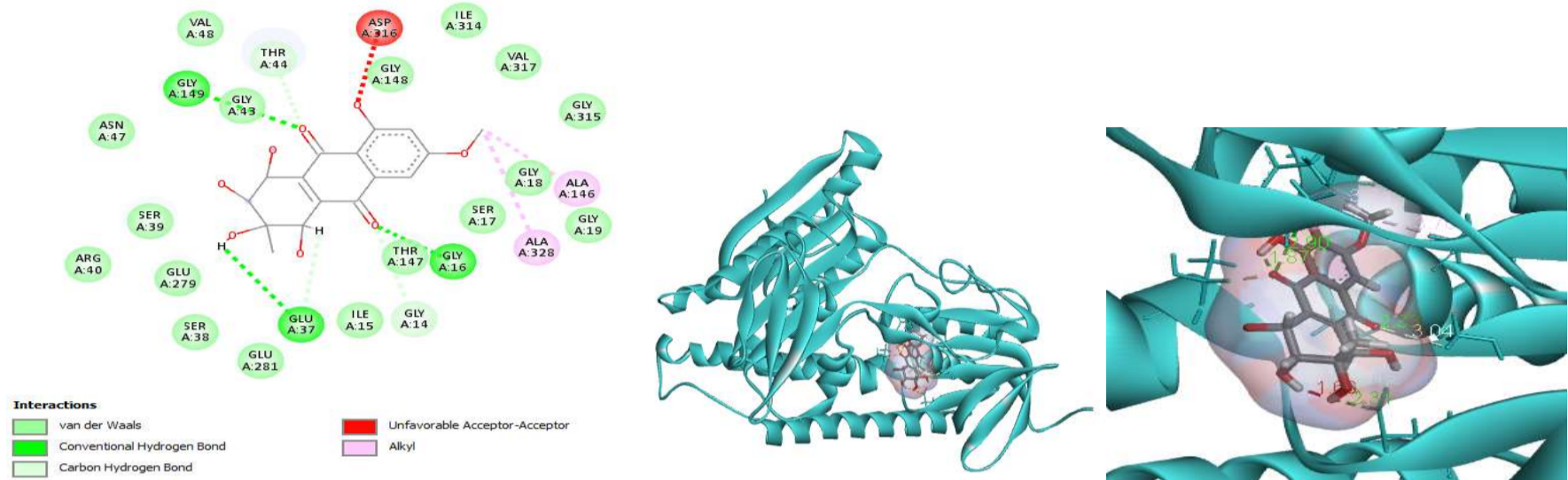
La cystathionine beta lyase forme avec le fongicide pyrimethanil 15 interactions incluant 4 interactions hydrophobiques avec les résidus Phe362, Tyr137, Tyr 137 et Val360, 2 interactions électrostatiques avec Arg396 et Arg388 et 9 interactions de Van Der Waals avec les résidus Ser361, Lys236, Asn184, Pro185, Pro372, Met390, Ser376, Gly138 et Asp135. Quant au fongicide Cyprodinil 19 interactions sont établies avec cette enzyme : une interaction hydrogène formée avec le résidu Arg396, 3 interactions hydrophobiques (Val360, Tyr137 et Tyr137), une interaction électrostatique formée avec le résidu Arg396 et 14 interactions de Van Der Waals (Thr213, Asn184, Pro185, Pro372, Arg388, Ser376, His377, Gly138, Ser361, Lys236, Phe362, Glu180, Met390 et Met214). En plus, la même enzyme établie 16 interactions avec le fongicide Mepanipyrim. L'Arg396 fournit une interaction hydrogène au ligand, la Val360, Tyr137, Tyr137, Pro185 et Met390 forment des interactions hydrophobiques, l'Arg388 forme une interaction électrostatique et l'Asp135, Pro372, Ser361, Ser376, Gly138, Gly139, Asn141, Asn389 et Leu136 établissent des interactions de Van Der Waals. Pour les ligands d'origine fongique, la bassianin forme 14 interactions, dont 2 interactions hydrogènes (Arg396, Asp135) et 12 interactions de Van Der Waals (Arg388, Gly138, Tyr137, Ser376, Val360, Pro372, Asn184, Pro185, His377, Met390, Glu180, Leu136). Camptothecin forme 16 interactions dont une interaction hydrogène avec l'Arg388, 2 interactions hydrophobiques avec la Tyr137 et Tyr137 et 13 interactions de Van Der Waals avec Val360, Arg396, Asn184, Pro372, Pro185, Ser376, Gly138, Gly139, Asn141, Arg142, His377, Met390 et Asp135. Le 8-O-di methylaverufin forme avec cet enzyme 16 interactions dont 3 interactions d'hydrogènes avec Arg396, Arg388 et Arg388, 6 interactions hydrophobiques avec Pro185, Val360, Met390, Pro372, Tyr137 et Tyr137 et 7 interactions de Van Der Waals. La tenellin interagit avec le site actif de l'enzyme en formant 23 interactions dont 3 liaisons d'hydrogène avec l'Arg396, Asn184 et Asn184, 7 interactions hydrophobiques avec Met214, Phe362, Phe362, Tyr137, Tyra37, Tyr137, Ser376, une interaction électrostatique avec Arg388 et 12 interactions de Van Der Waals. Pour les ligands actinomycétales, la cystathionine beta lyase interagit avec l'Anthraquinones en formant 14 interactions dont 3 interactions d'hydrogène avec l'Arg388, Asn184 et Arg396, une interaction hydrophobique Tyr137 et 10 interactions de Van Der Waals. La diazepinomicin forme 26 interactions avec l'enzyme dont une interaction hydrogène Arg388, 9 interactions hydrophobiques avec Tyr137, Tyr137, Tyr137, Val360, Val360, Val360, Met114, Met114, Tyr137 et 16 interactions de Van Der Waals. L'hygromycin, a formé 22 interactions dont 4 interactions hydrogènes (Arg388, Arg396, Asn184, Lys236), 2 interactions hydrophobiques (Val360, Tyr137) et 16 interactions de Van Der Waals. La lomofungin a formé avec cette

enzyme 17 interactions dont 2 interactions hydrogènes (Arg388, Gly138), 3 interactions hydrophobiques (Tyr137, Tyr137, Val360) et 12 interactions de Van Der Waals. Finalement, cystathionine beta lyase forme 18 interactions avec la tetracycline dont 8 interactions hydrogènes (Ser376, Arg388, Arg388, Asp135, Asn184, Asn184, Arg396, Pro185) et 10 interactions de Van Der Waals.

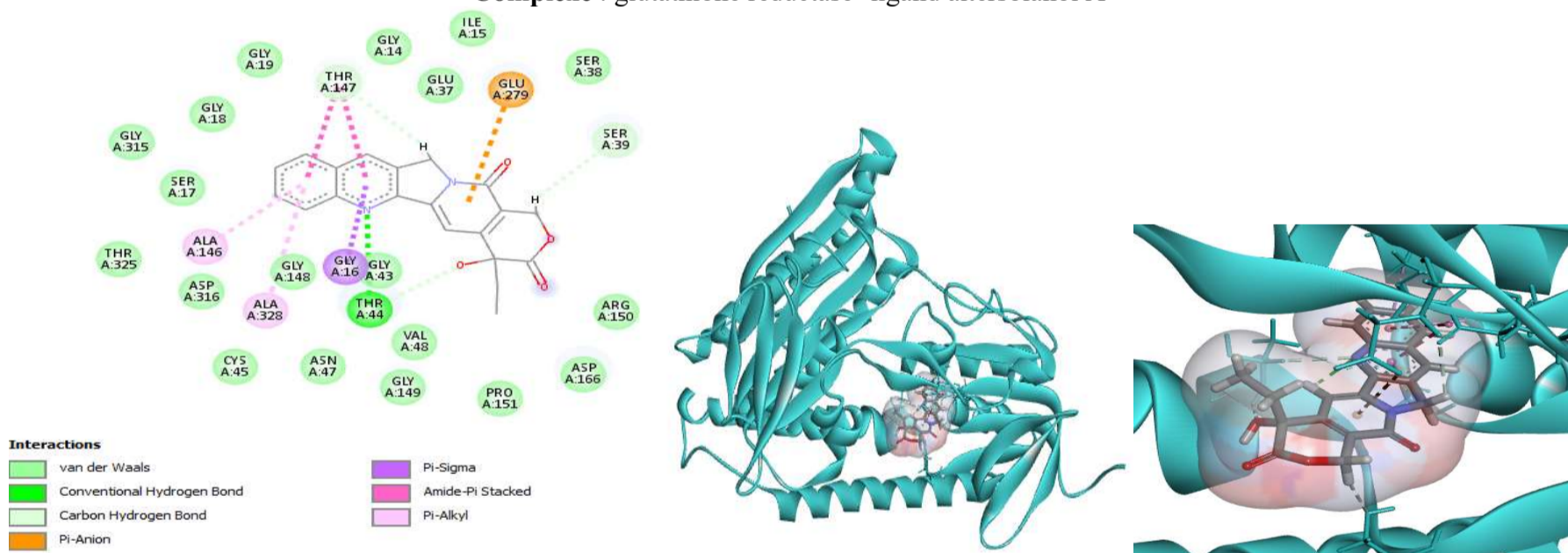
Pour le glutathione réductase nous avons choisi d'étudier les interactions établies avec les ligands fongiques (altersolanol A, Camptothecin, Cerinolactone, Emodin, acide gibberellique, 6-O methyl alaternin) et les ligands actinomycétales (Anthraquinones, Cycloheximide, Nikkomycin, Polyoxin B, Streptothricin et Transvalencin) (**Figure 51, Tableau 32**).



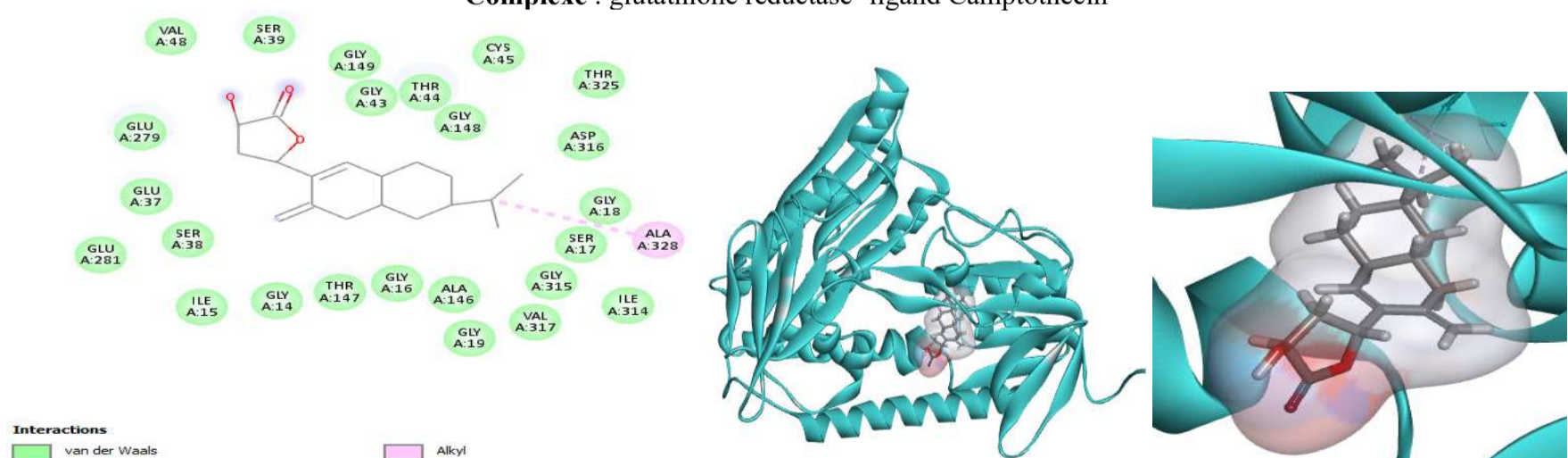
Complexe : glutathione réductase- fongicide Carbendazim



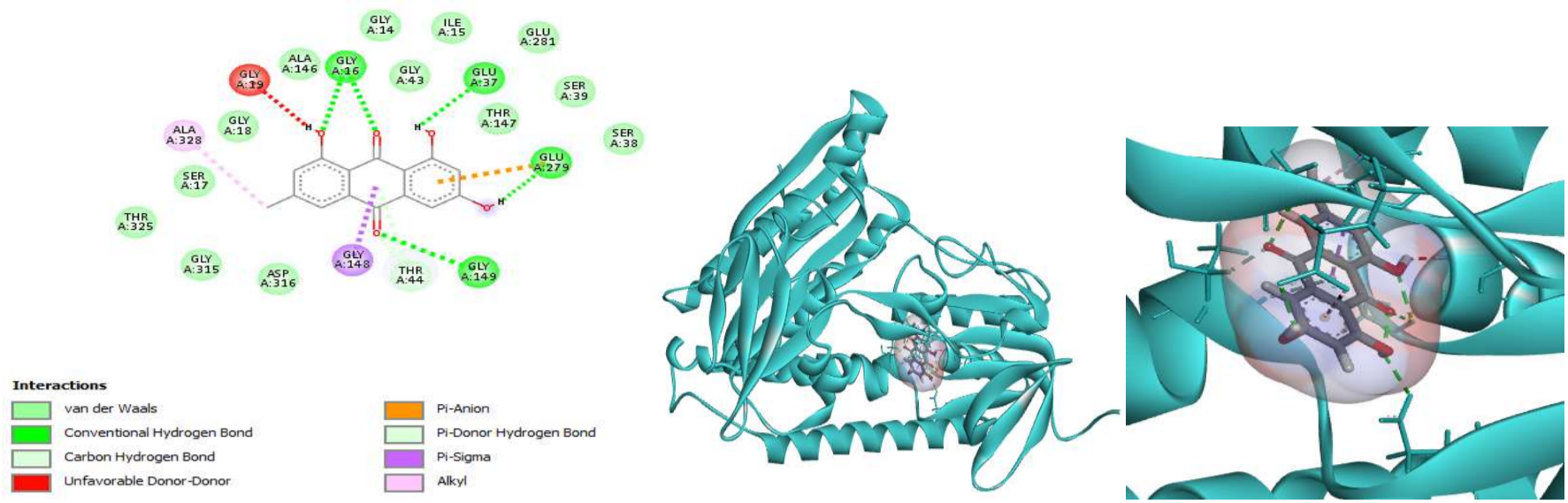
Complexe : glutathione réductase- ligand altersolanol A



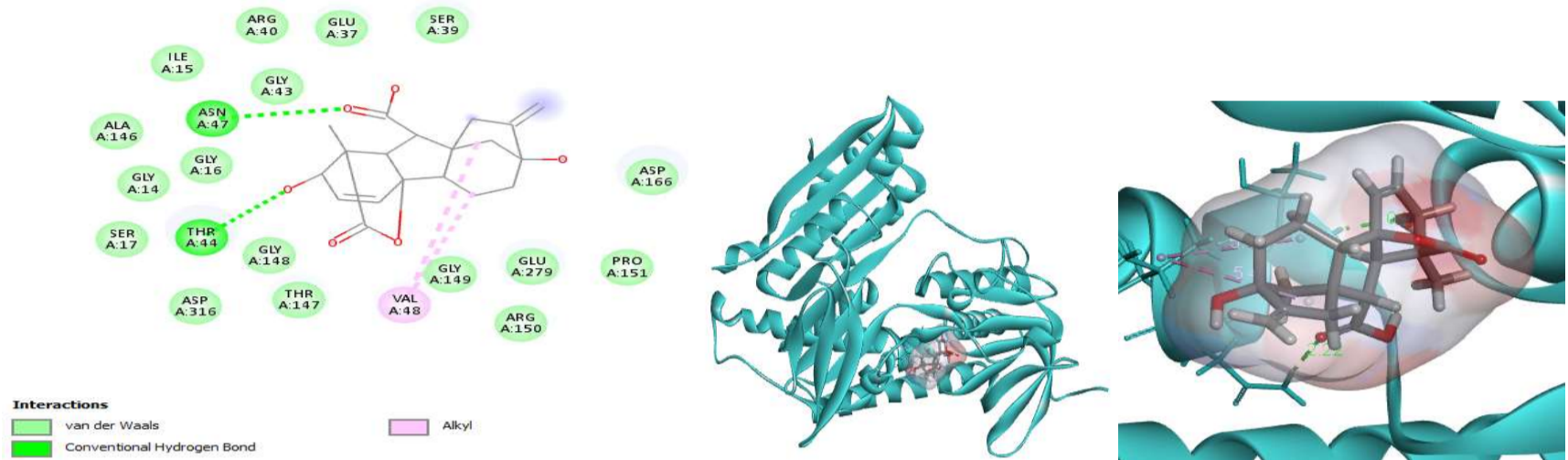
Complexe : glutathione réductase- ligand Camptothecin



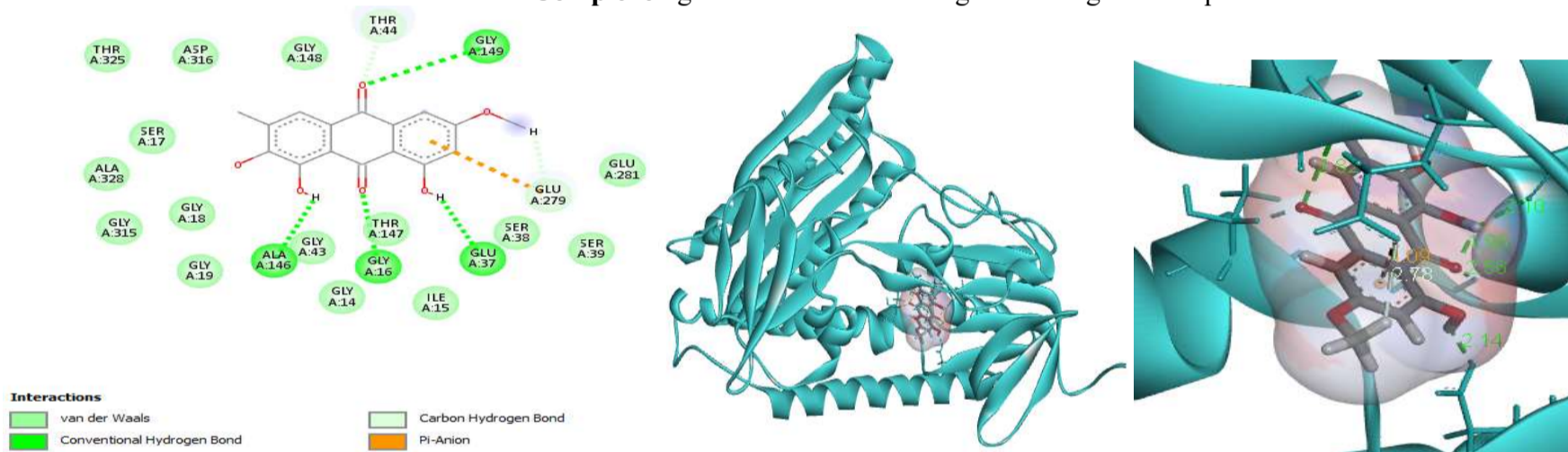
Complexe : glutathione réductase- ligand Cerinolactone



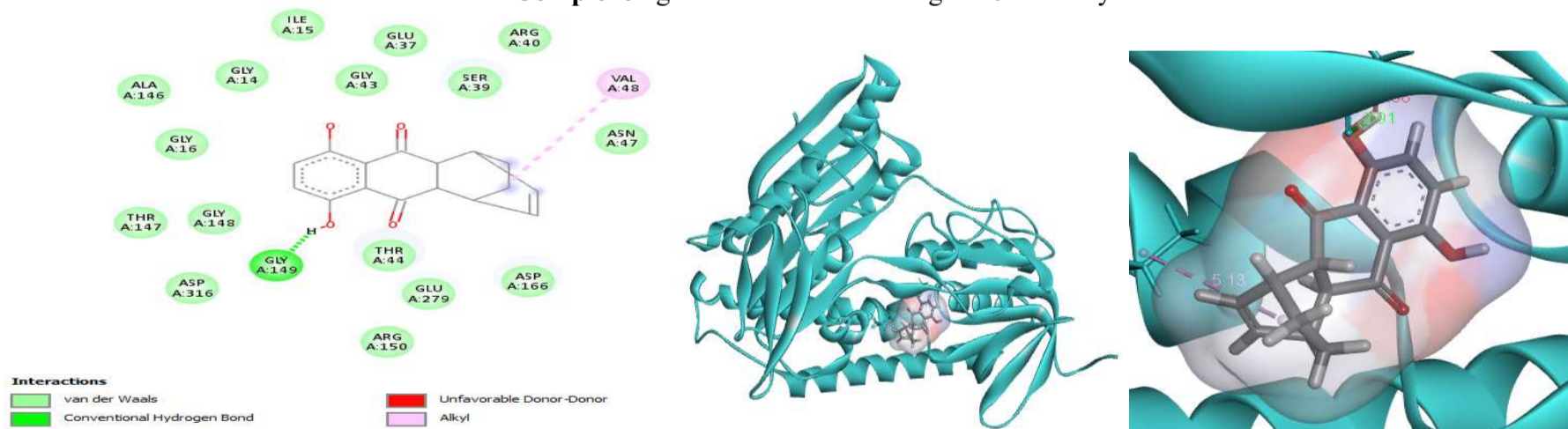
Complexe : glutathione réductase- ligand Emodin



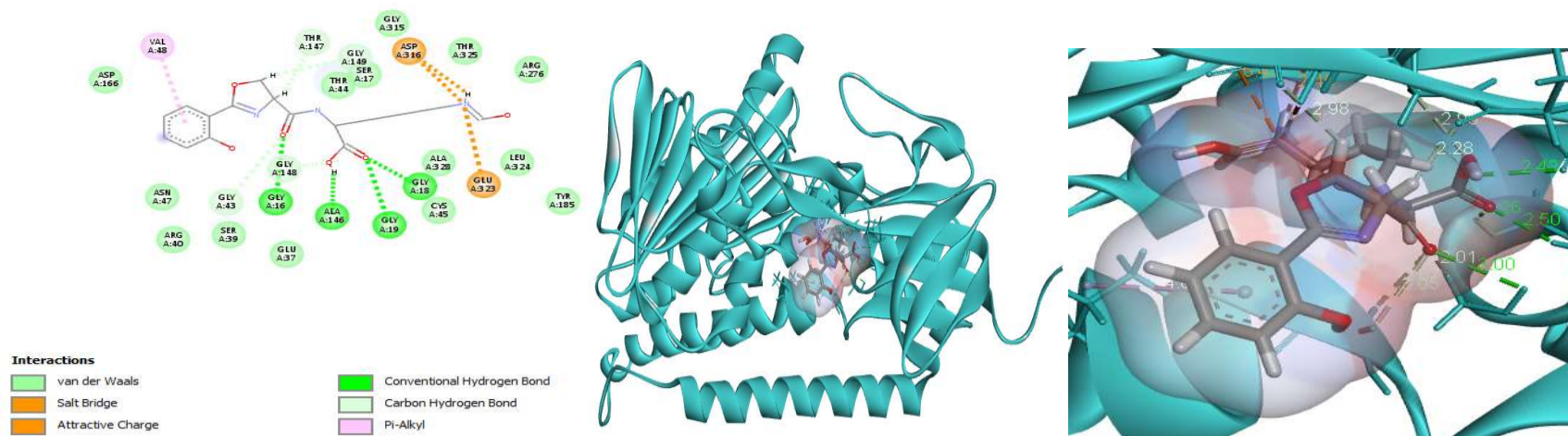
Complexe : glutathione réductase- ligand acide gibberellique



Complexe : glutathione réductase- ligand 6-O methyl alaternin



Complexe : glutathione réductase- ligand Anthraquinone



Complexe : glutathione réductase- ligand Transvalencin

Figure 51. Illustrations 2D et 3D des interactions entre la glutathione réductase et ses meilleurs ligands

Tableau 32. Différents types d'interactions entre le récepteur glutathione réductase et les ligands fongiques et actinomycétales.

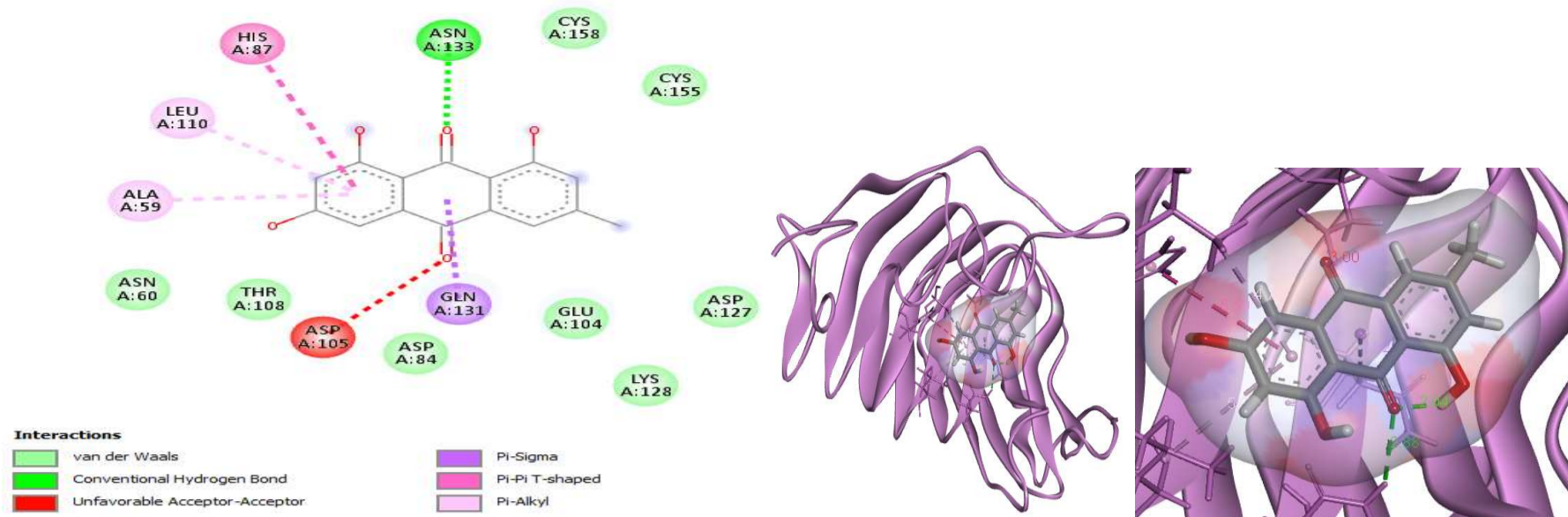
	Ligand	Interaction hydrogène	Interaction hydrophobique	Interaction électrostatique	Interaction Van Der waals
Fongicide	Carbendazim	Ala146, Thr44, Gly18, Gly14, Ser39	Ala146, Gly16, Ala328	Asp316	Gly315, Gly148, Gly19, Thr147, Glu37, Ile15, Gly43, Ser17, Thr325, Ile314
Champignons	Altersolanol A	Gly16, Glu37, Gly149, Thr44, Gly14, Glu37	Ala328, Ala146	/	Glu281, Ser38, Glu279, Ile15, Thr147, Gly19, Ser17, Gly18, Gly315, Ile314, Gly148, Gly43, Val48, Asn47, Arg40, Ser39, Val317
	Camptothecin	Ser39, Thr44, Thr44, Thr147	Thr147, Thr147, Ala328, Ala146, Gly16	Glu279	Asp166, Asn47, Val48, Gly43, Gly149, Arg150, Pro151, Gly148, Asp316, Ser17, Gly315, Gly18, Gly19, Gly14, Glu37, Ser38, Ile15, Thr325, Cys45
	Cerinolactone		Ala328		Gly19, Ala146, Ile314, Gly18, Gly315, Asp316, Gly148, Thr44, Gly43, Gly149, Glu279, Ser39, Glu37, Gly14, Thr147, Ile15, Gly16, Ser17, Thr325, Cys45, Val48, Ser38, Glu281, Val317
	Emodin	Glu279, Glu37, Gly16, Gly16, Gly149, Thr44, Thr44	Gly148, Ala328	Glu279	Thr147, Gly14, Gly43, Ile15, Ala146, Gly18, Ser17, Asp316, Ser38, Ser39, Glu281, Thr325, Gly315
	Acide gibberellique	Asn47, Thr44	Val48, Val48	/	Asp166, Gly149, Glu279, Gly148, Thr147, Gly16, Gly14, Ser17, Ile15, Gly43, Glu37, Ser39, Arg40, Ala146, Asp316, Arg150, Pro151
	6-O methyl alaternin	Thr44, Gly149, Ala146, Gly16, Glu37, Glu279	/	Glu279	Gly148, Asp316, Gly18, Ala328, Ser17, Gly315, Gly19, Gly43, Gly14, Thr147, Ile15, Ser39, Ser38, Glu281, Thr325
Actinomycètes	Anthraquinone	Gly149	Val48	/	Asp316, Arg150, Thr44, Asp166, Asn47, Ser39, Ile15, Glu37, Gly14, Gly43, Gly16, Thr147, Gly148, Arg40, Ala146, Glu279
	Cycloheximide	Ser17, Thr44	Ala328, Ala328, Ala328, Ala146	/	Ile314, Gly315, Asp316, Gly19, Gly148, Gly43, Ser39, Glu37, Ser38, Glu281, Gly14, Thr147, Gly16, Cys45, Thr325, Gly18, Leu324, Ile15, Gly149, Val317
	Nikkomycin	Gly148, Gly16, Ala146, Gly43, Glu279, Asp166 Thr44, Ser17, Gly149, Thr147, Thr147, Tyr185	Val48, Ala328, Cys45	Asp316, Asp316	Thr325, Leu324, Ile186, Glu323, Arg276, Gly315, Arg150, Pro151, Asn47, Glu281, Ser39, Glu37, Ile15, Gly14, Gly18, Gly42, Cys50
	Polyoxin B	Asp316, Asp316, Asp316, Ala146, Asp166, Ser39, Thr147, Gly148, Glu37, Thr44, Gly14, Gly149	Val48	Glu279	Pro151, Arg276, Arg150, Gly16, Gly19, Gly18, Gly315, Ala328, Thr325, Leu324, Cys45, Glu323, Ser17, Ile15, Gly43, Glu281, Arg40, Ser38
	Streptothricin	Val356, Val356	/	Glu189	Phe322, Tyr185, Glu323, Ile186, Ser355, Pro354, Phe358, Leu324, Val51, Cys45, Val46, Tyr102, Ile329, Thr325, Cys50, Pro326, Val357, Lys53, Gly49, Ile20
	Transvalencin	Thr147, Ala146, Gly18, Gly19, Gly149, Gly148, Gly16, Gly43	Val48	Asp316, Glu323, Asp316	Thr325, Glu37, Arg40, Ser39, Asn47, Asp166, Gly315, Thr44, Ala328, Ser17, Leu324, Arg276, Cys45, Tyr185

L'enzyme glutathione réductase forme avec le fongicide Carbendazim 19 interactions qui sont 5 interactions hydrogènes (Ala146, Thr44, Gly18, Gly14, Ser39) 3 interactions hydrophobiques (Ala146, Gly16, Ala328), une interaction électrostatique (Asp316) et 10 interactions de Van Der Waals (Gly315, Gly148, Gly19, Thr147, Glu37, Ile15, Gly43, Ser17, Thr325, Ile314). En ce qui concerne les ligands fongiques, l'altersolanol A forme 25 interactions dont 6 interactions hydrogènes (Gly16, Glu37, Gly149, Thr44, Gly14, Glu37), 2 interaction hydrophobiques (Ala328, Ala146) et 17 interactions de Van Der Waals. La camptothecin forme 29 interactions dont 4 interactions hydrogènes avec Ser39, Thr44, Thr44, Thr147, 5 interactions hydrophobiques avec Thr147, Thr147, Ala328, Ala146, Gly16, une interaction électrostatique avec Glu279 et 19 interactions de Van Der Waals. La cerinolactone a formé avec cet enzyme 25 interactions dont une interaction hydrophobique avec Ala328 et 24 interactions de Van Der Waals. Le Emodin a interagit avec le site actif de l'enzyme en établissant 23 interactions dont 7 liaisons d'H avec Glu279, Glu37, Gly16, Gly16, Gly149, Thr44, Thr44, 2 interactions hydrophobiques avec Gly148, Ala328, une interaction électrostatique avec Glu279 et 13 interactions de Van Der Waals. L'acide Gibberellique forme avec l'enzyme 21 interactions dont 2 interactions hydrogènes avec Asn47, Thr44, 2 interactions hydrophobiques avec Val48, Val48 et 17 interactions de Van Der Waals avec Asp166, Gly149, Glu279, Gly148, Thr147, Gly16, Gly14, Ser17, Ile15, Gly43, Glu37, Ser39, Arg40, Ala146, Asp316, Arg150, Pro151. Le 6-O methyl alaternin forme 22 interactions dont 6 liaisons d'hydrogène (Thr44, Gly149, Ala146, Gly16, Glu37, Glu279), une électrostatique (Glu279) et 15 Van Der Waals. Pour les ligands actinomycétales, l'antraquinones a formé 18 interactions avec l'enzyme dont une interaction hydrogène avec Gly149, une interaction hydrophobique avec Val48 et 16 interactions de Van Der Waals. Le cycloheximide, forme 26 interactions dont 2 interactions hydrogènes Ser17, Thr44, 4 interactions hydrophobiques avec Ala328, Ala328, Ala328, Ala146 et 20 interactions de Van Der Waals. La nikkomyicin a formé 34 interactions dont 12 interactions hydrogènes (Gly148, Gly16, Ala146, Gly43, Glu279, Asp166 Thr44, Ser17, Gly149, Thr147, Thr147, Tyr185), 3 interactions hydrophobiques (Val48, Ala328, Cys45), 2 interactions électrostatiques (Asp316, Asp316) et 17 interactions de Van Der Waals. La polyoxin B a formé avec cette enzyme 32 interactions dont 12 interactions hydrogènes (Asp316, Asp316, Asp316, Ala146, Asp166, Ser39, Thr147, Gly148, Glu37, Thr44, Gly14, Gly149), une interaction hydrophobique (Val48), une interaction électrostatique (Glu279) et 18 interactions de Van Der Waals. La streptothricin forme 23 interactions dont 2 liaisons d'hydrogènes (Val356, Val356), une liaison électrostatique (Glu189) et 20 de Van Der Waals (Phe322, Tyr185, Glu323, Ile186,

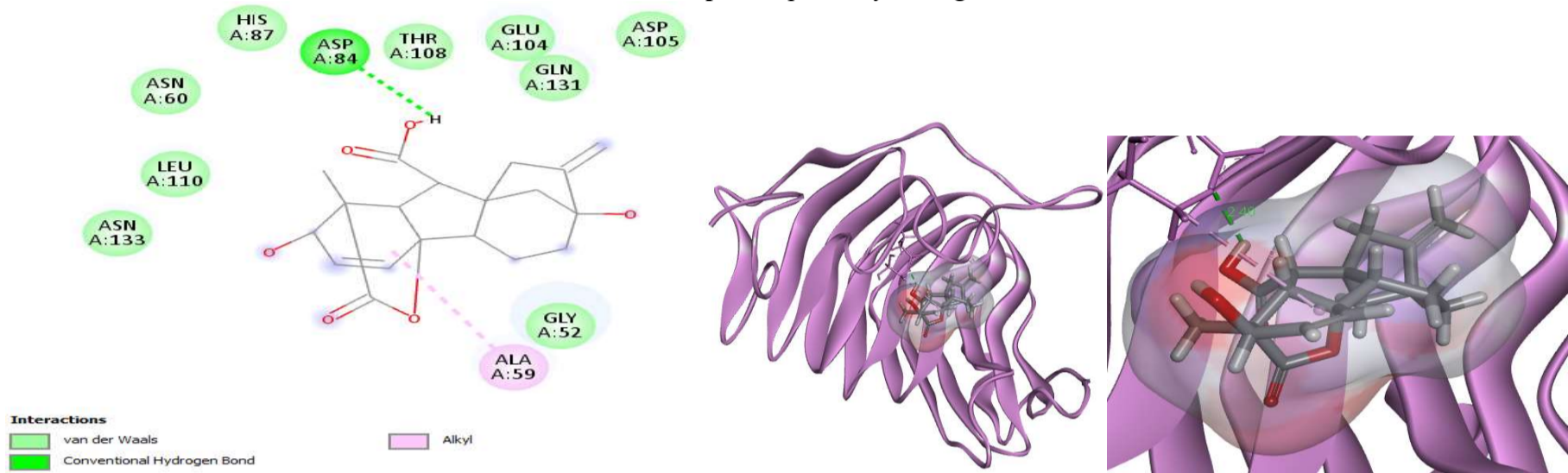
Ser355, Pro354, Phe358, Leu324, Val51, Cys45, Val46, Tyr102, Ile329, Thr325, Cys50, Pro326, Val357, Lys53, Gly49, Ile20). Finalement, la glutathione réductase forme 26 interactions avec la transvalencin dont 8 interactions hydrogènes (Thr147, Ala146, Gly18, Gly19, Gly149, Gly148, Gly16, Gly43), une hydrophobique (Val48), 3 électrostatiques (Asp316, Glu323, Asp316) et 14 interactions de Van Der Waals.

Pour l'homoserine O-acétyltransférase, les résultats du docking moléculaire montrent que pour l'ensemble des métabolites testés aucun n'a donné un score d'énergie répondant à la condition de sélection sur laquelle on s'est basé dans notre analyse, à savoir un score inférieur à la valeur de référence. Cela peut être expliqué par le fait qu'une molécule ne présente d'affinité pour les enzymes cibles étudiées et donc aucun candidat inhibiteur potentiel n'est présent dans notre collection de molécules.

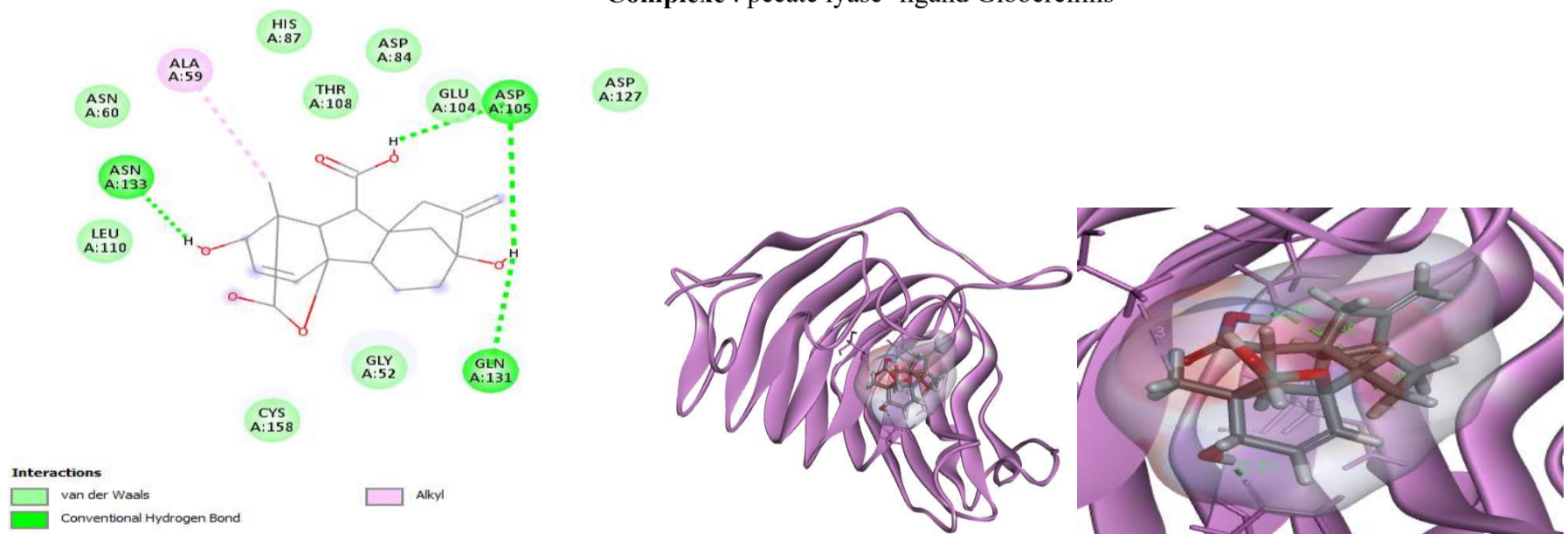
Pour le Pecate lyase, nous avons choisi les ligands fongiques (Emodin, Gibberllins, acide Gibberellique, Xanthone) et des ligands actinomycétales (Anthraquinones, Antimycin, Azalomycin et Lomofungin) (**Figure 52, Tableau 33**).



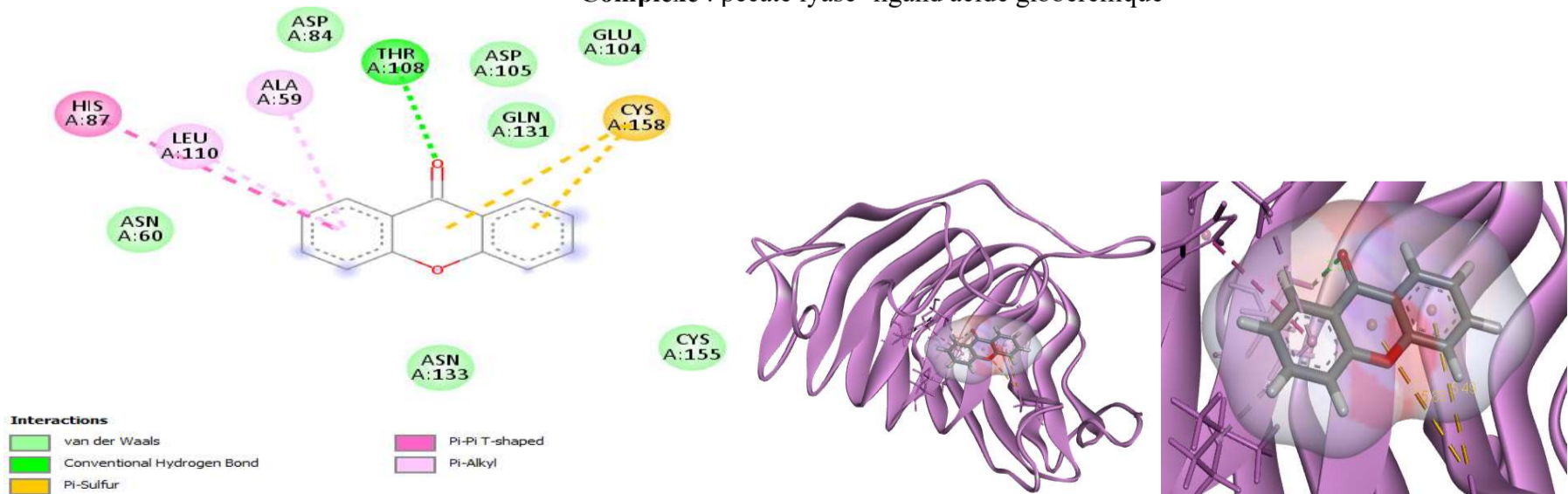
Complexe : pectate lyase- ligand Emodin



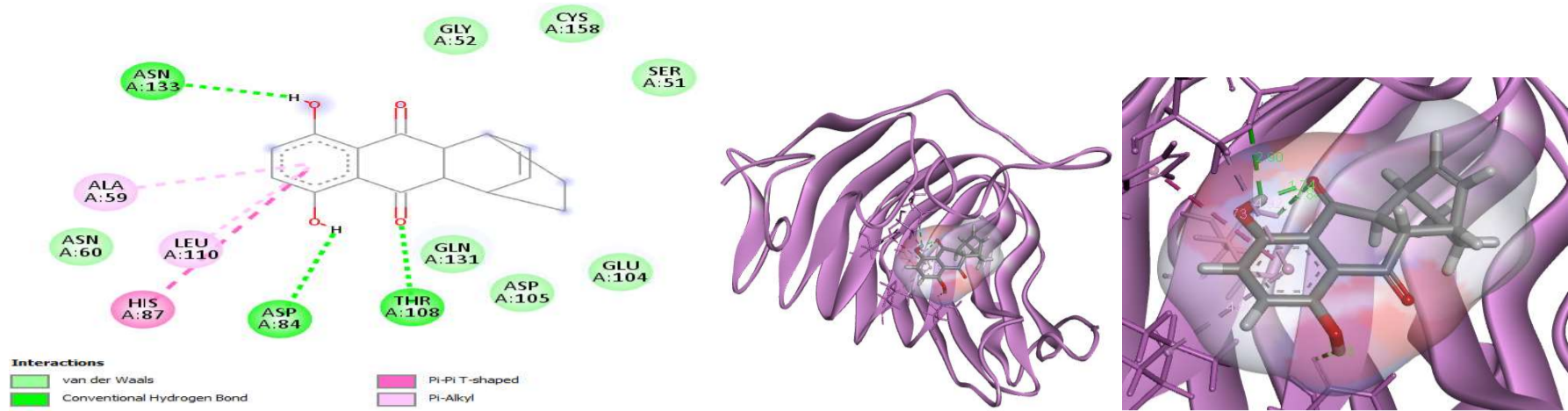
Complexe : pectate lyase- ligand Gibberellins



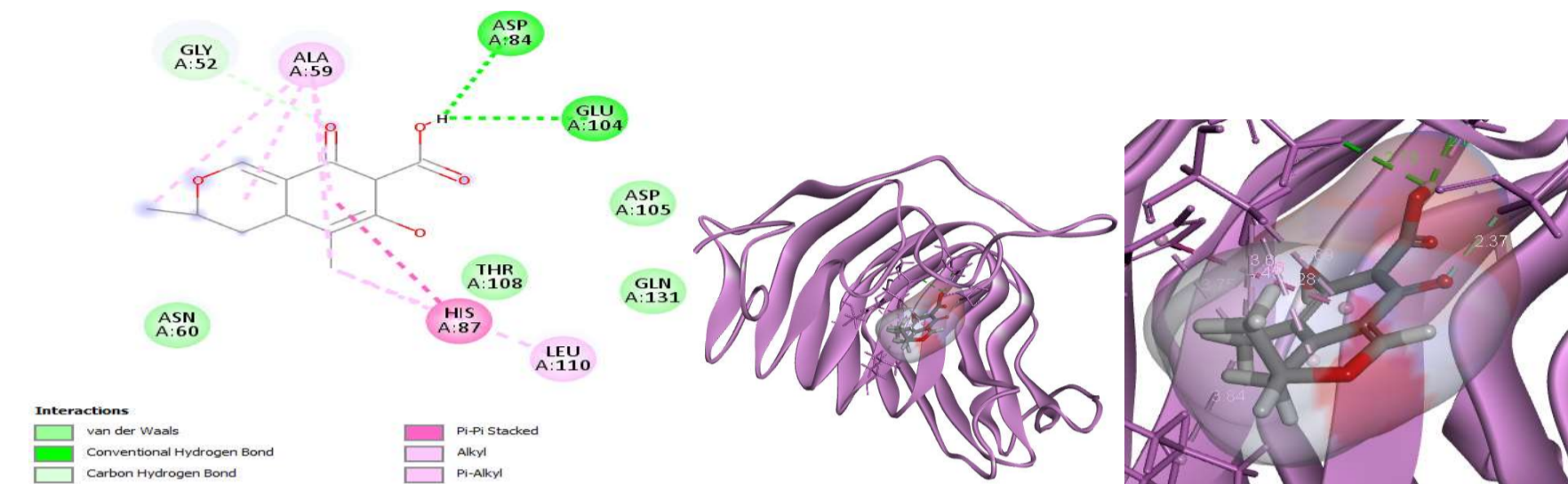
Complexe : pectate lyase- ligand acide gibberellique



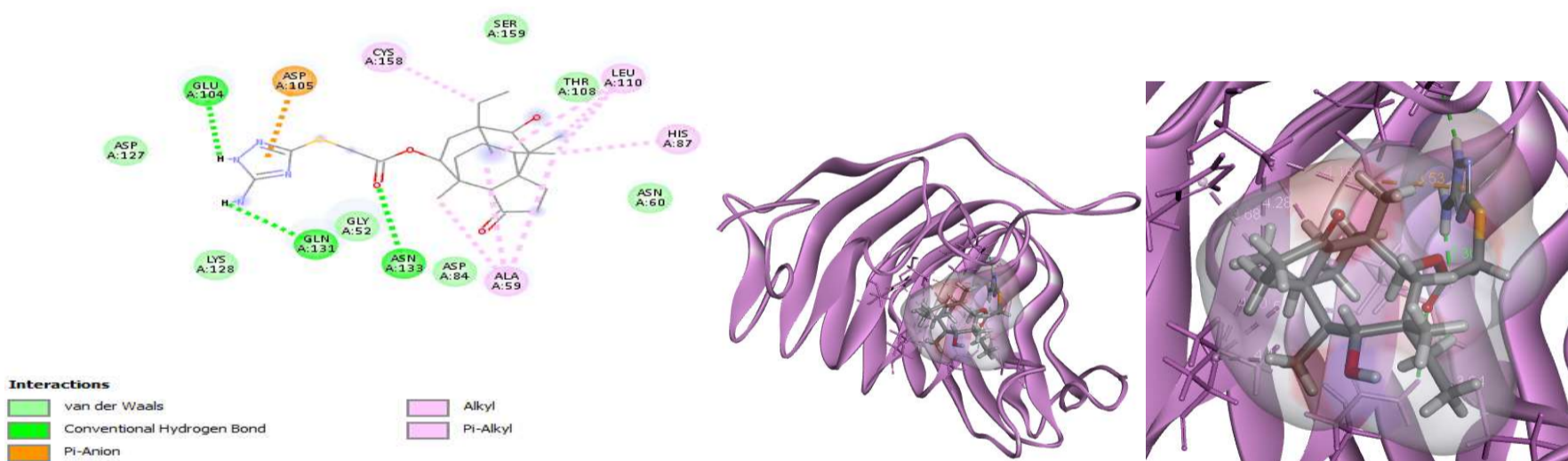
Complexe : pectate lyase- ligand Xanthone



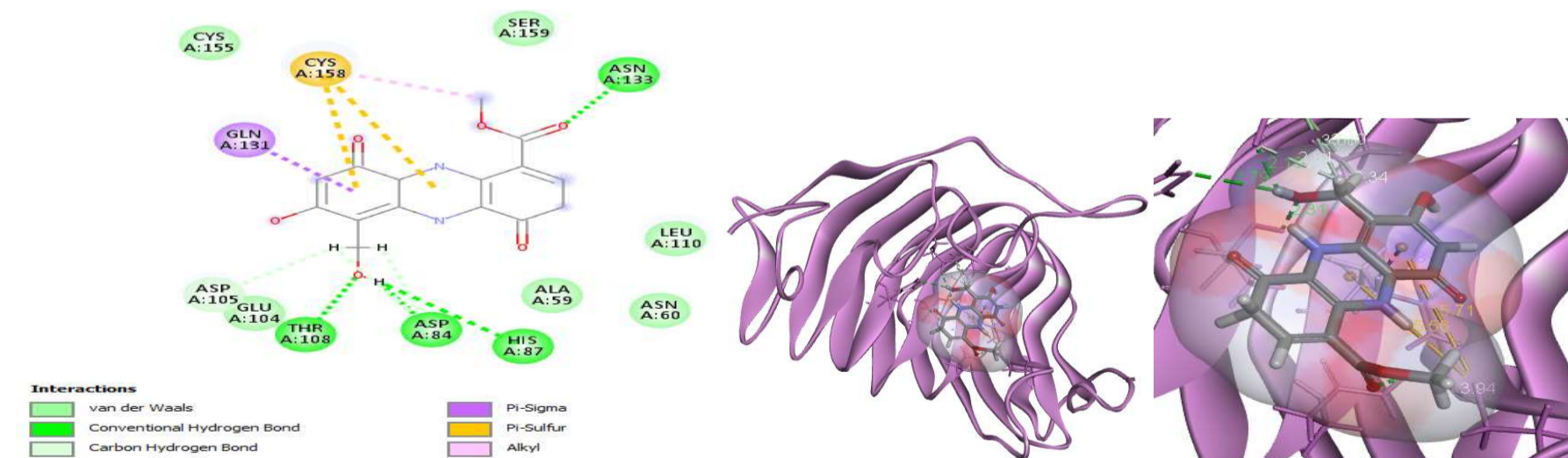
Complexe : pecate lyase- ligand Anthraquinone



Complexe : pecate lyase- ligand Antimycin



Complexe : pecate lyase- ligand Azalomycin



Complexe : pecate lyase- ligand Lomofungin

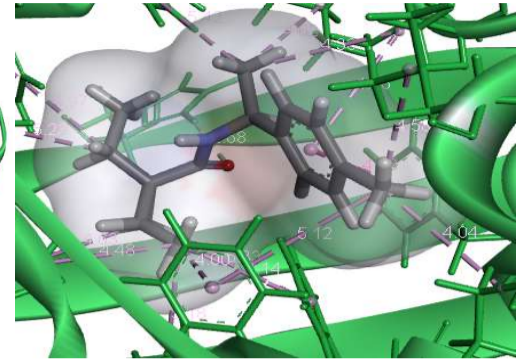
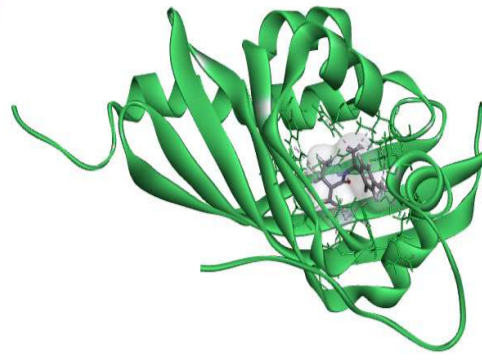
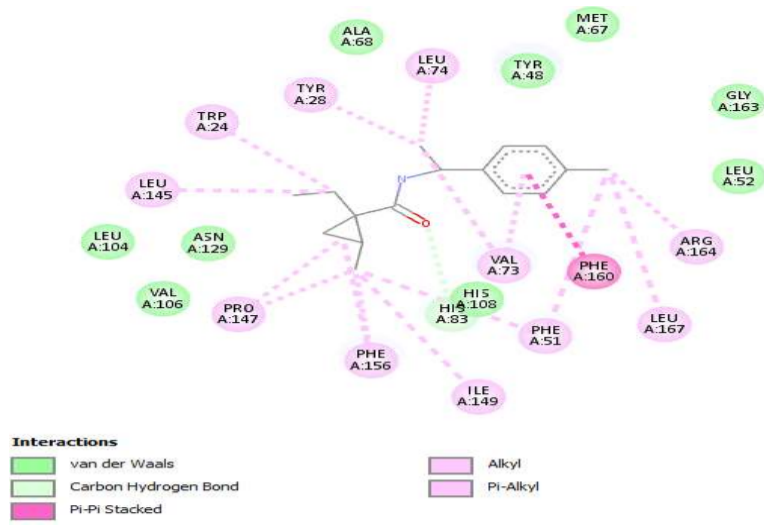
Figure 52. Illustrations 2D et 3D des interactions entre la pecate lyase et ses meilleurs ligands

Tableau 33. Différents types d'interactions entre le récepteur peccate lyase et les ligands fongiques et actinomycétales.

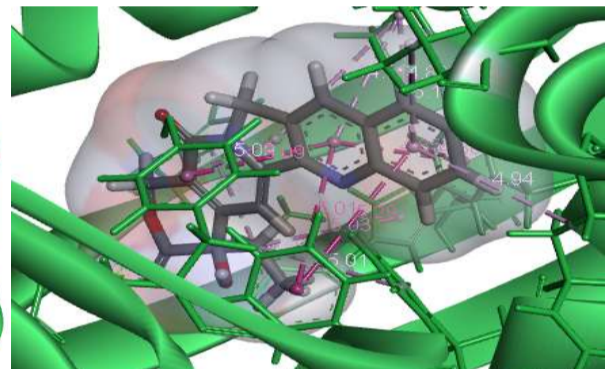
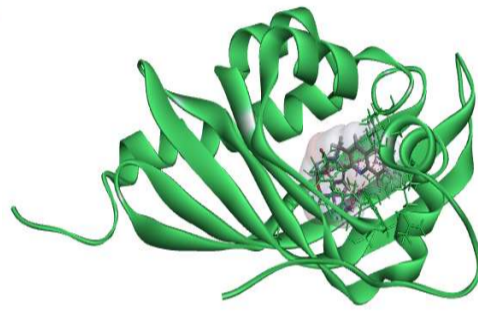
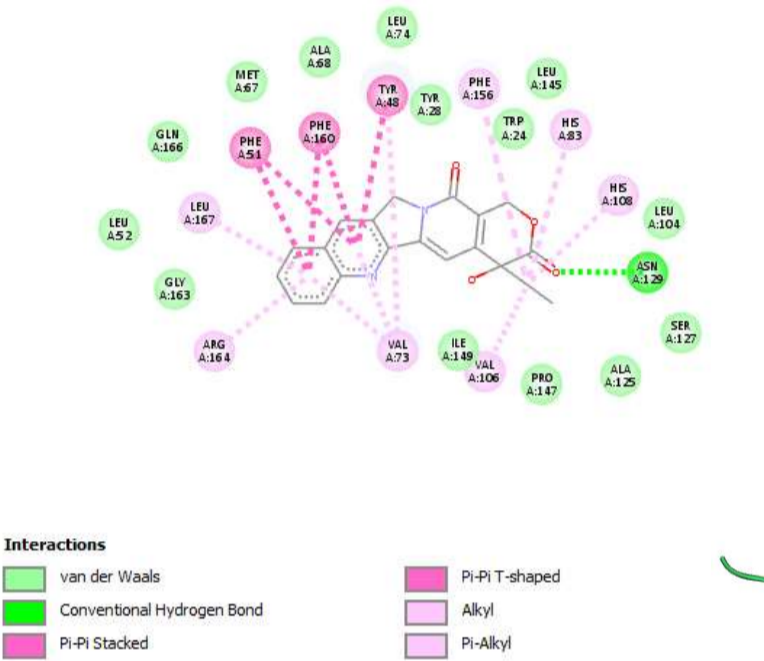
	Ligand	Interaction hydrogène	Interaction hydrophobique	Interaction électrostatique	Interaction Van Der waals
Champignons	Emodin	Asn133	His87, Leu110, Ala59, Gln131	/	Asn60, Thr108, Asp84, Glu104, Asp127, Cys155, Cys158, Lys128
	Gibberellins	Asp84	Ala59	/	Leu110, Asn60, His87, Thr108, Asp105, Glu104, Gln131, Gly52, Asn133
	Acide gibberellique	Asp105, Asp105, Gln131, Asn133	Ala59	/	Glu104, Asp84, His87, Thr108, Asn60, Leu110, Asp127, Cys158, Gly52
	Xanthone	Thr108	His87, Ala59, Leu110	Cys158, Cys158	Glu104, Gln131, Asp105, Asp84, Asn60, Asn133, Cys155
Actinomycètes	Anthraquinone	Asn133, Asp84, Thr108	Ala59, His87, Leu110	/	Asn60, Asp105, Gln131, Glu104, Cys158, Gly52, Ser51
	Antimycin	Glu104, Asp84, Gly52	Ala59, Ala59, Ala59, Ala59, His87, His87, Leu110	/	Asp105, Gln131, Thr108, Asn60
	Azalomycin	Asn133, Gln131, Glu104	Cys158, Ala59, Ala59, Ala59, His87, Leu110, Leu110, Leu110	Asp105	Ser159, Thr108, Gly52, Asn60, Asp127, Lys128, Asp84
	Lomofungin	Asn133, Thr108, Asp84, His87, Asp105, Asp84	Cys158, Gln131	Cys158, Cys158	Ser159, Cys155, Glu104, Ala59, Asn60, Leu110

Pour le groupe des métabolites fongiques, le peccate lyase a formé avec l'emodin 13 interactions dont une liaison d'H avec Asn133, 4 interactions hydrophobiques avec His87, Leu110, Ala59, Gln131, et 8 interactions de Van Der Waals. L'acide gibberellique forme avec l'enzyme 14 interactions dont 4 interactions hydrogènes avec Asp105, Asp105, Gln131, Asn133, une interaction hydrophobique avec Ala59 et 17 interactions de Van Der Waals. Le gibberellins forme 11 interactions dont un hydrogène (Asp84), 1 hydrophobique (Ala59) et 9 Van Der Waals. Le xanthone forme 13 interactions dont 1 hydrogène (Thr108), 3 hydrophobiques (His87, Ala59, Leu110), 2 électrostatiques (Cys158, Cys158) et 7 Van Der Waals (Glu104, Gln131, Asp105, Asp84, Asn60, Asn133, Cys155). Pour les ligands actinomycétales, l'antraquinones a formé 13 interactions avec l'enzyme dont 3 interactions hydrogènes avec Asn133, Asp84, Thr108, 3 interactions hydrophobiques avec Ala59, His87, Leu110 et 7 interactions de Van Der Waals. L'antimycin forme 14 interactions dont 3 interactions hydrogènes avec Glu104, Asp84, Gly52, 7 interactions hydrophobiques avec Ala59, Ala59, Ala59, Ala59, His87, His87, Leu110 et 4 interactions de Van Der Waals avec Asp105, Gln131, Thr108, Asn60. L'azalomycin a formé 19 interactions dont 3 interactions hydrogènes (Asn133, Gln131, Glu104), 8 interactions hydrophobiques (Cys158, Ala59, Ala59, Ala59, His87, Leu110, Leu110, Leu110), 1 interaction électrostatique (Asp105) et 7 interactions de Van Der Waals. La lomofungin a formé avec cette enzyme 16 interactions dont 6 interactions hydrogènes (Asn133, Thr108, Asp84, His87, Asp105, Asp84), 2 interactions hydrophobiques (Cys158, Gln131), 2 interactions électrostatiques (Cys158, Cys158) et 6 interactions de Van Der Waals.

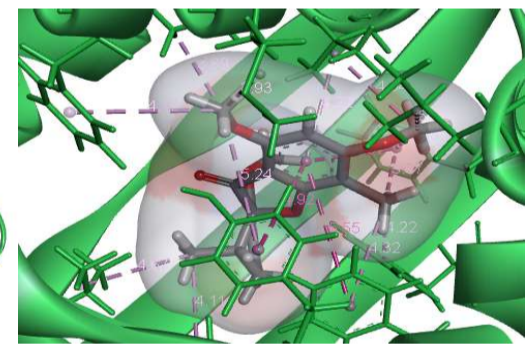
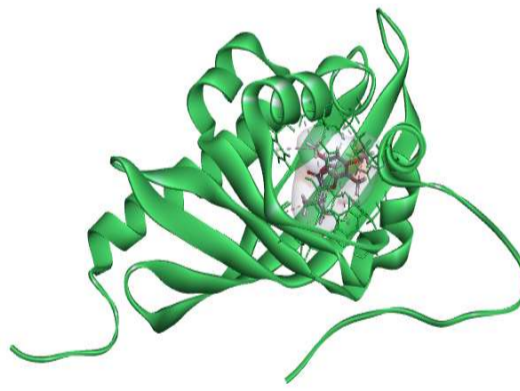
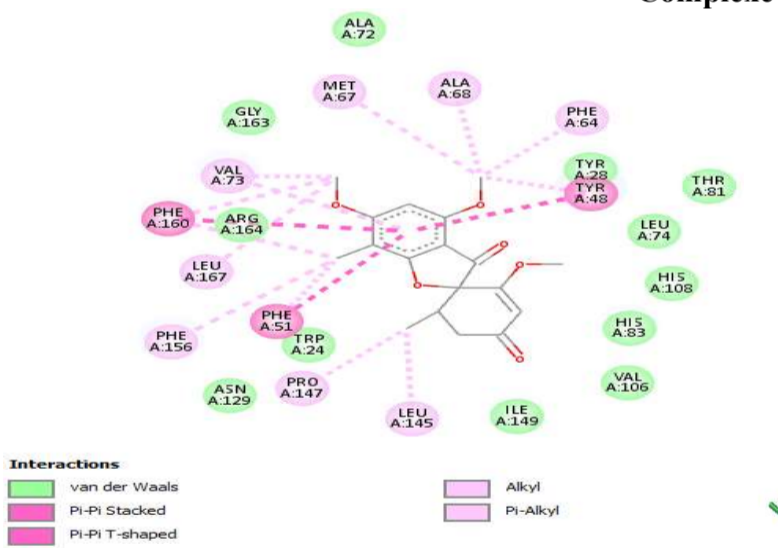
Pour le scytalone déshydratase, nous avons choisi les ligands fongiques (Camptothecin, Griseofulyin et Huperzine A) et un ligand actinomycétale qui est le Pentalenolactone (**Figure 53**, **Tableau 34**).



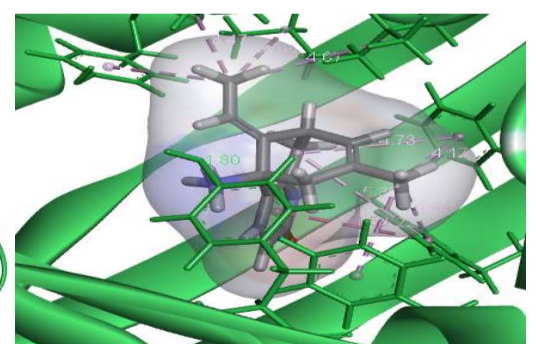
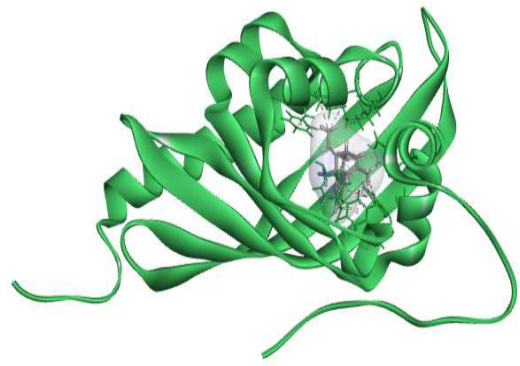
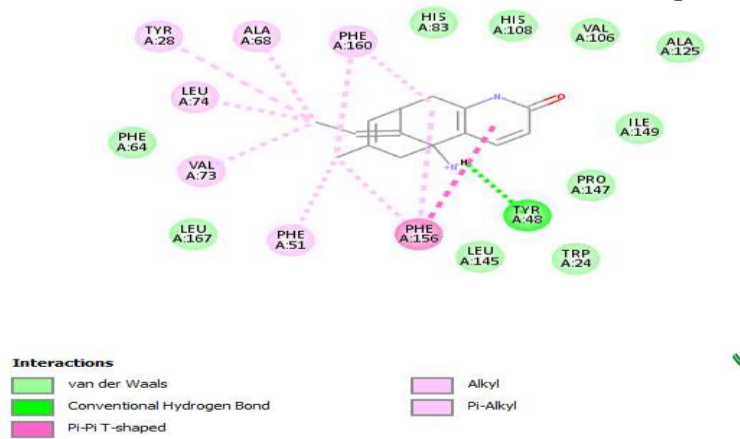
Complexe : Scytalone dehydratase - fongicide Carpropamid



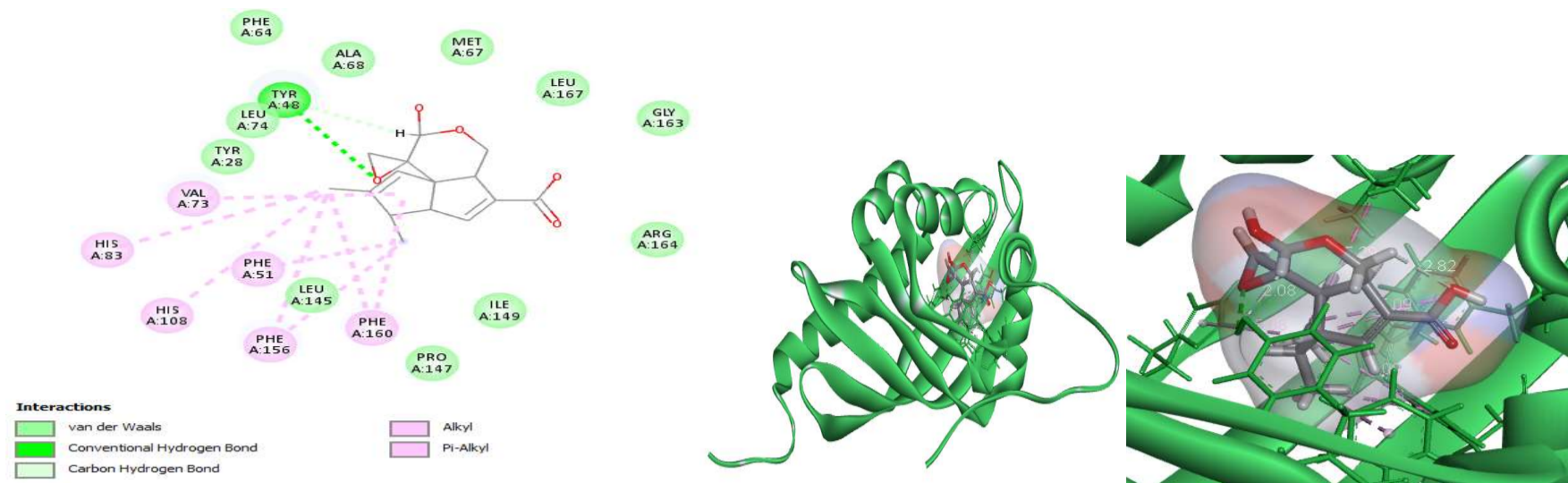
Complexe : Scytalone dehydratase - ligand Camptothecin



Complexe : Scytalone dehydratase - ligand Griseofulvin



Complexe : Scytalone dehydratase - ligand Huperzine A



Complexe : Scytalone dehydratase - ligand Pentalenolactone

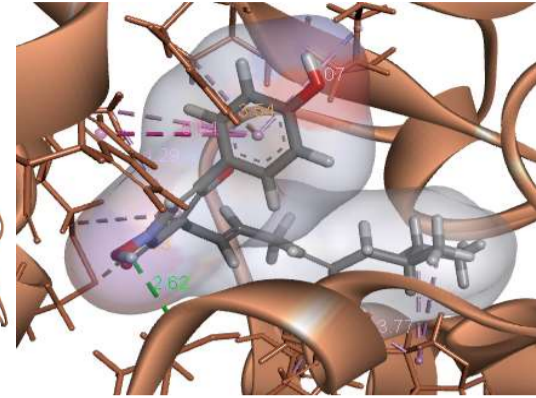
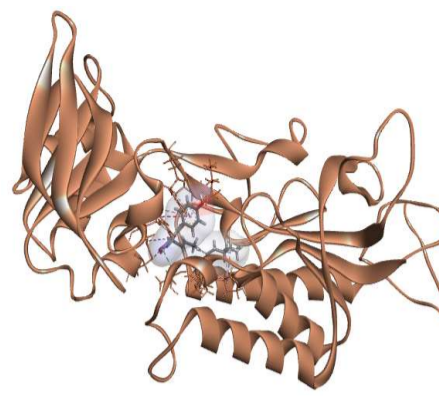
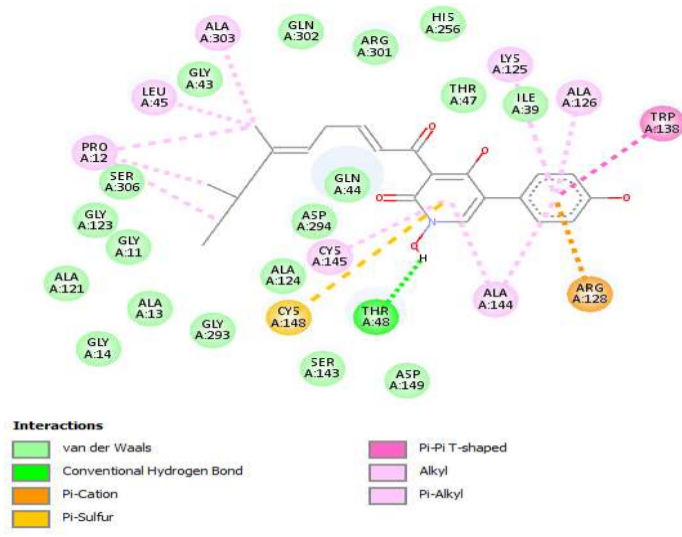
Figure 53. Illustrations 2D et 3D des interactions entre la Scytalone dehydratase et ses meilleurs ligands

Tableau 34. Types d'interactions entre le récepteur scytalone dehydratase et les meilleurs ligands fongiques et actinomycétales.

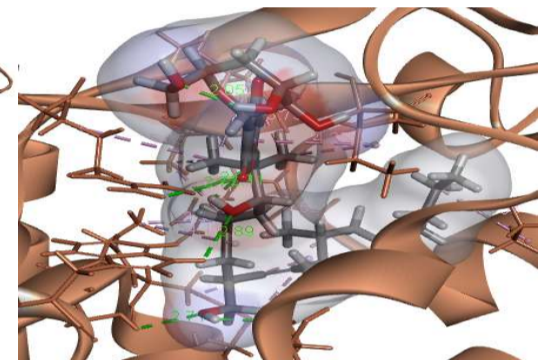
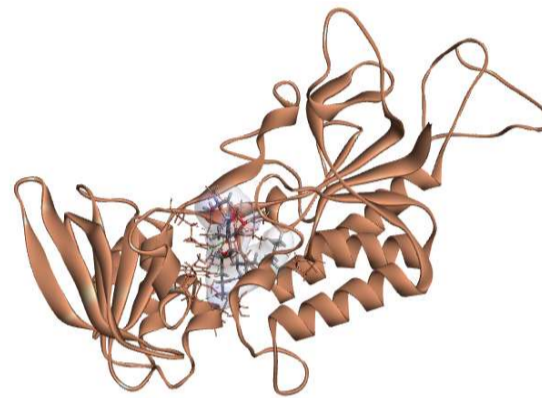
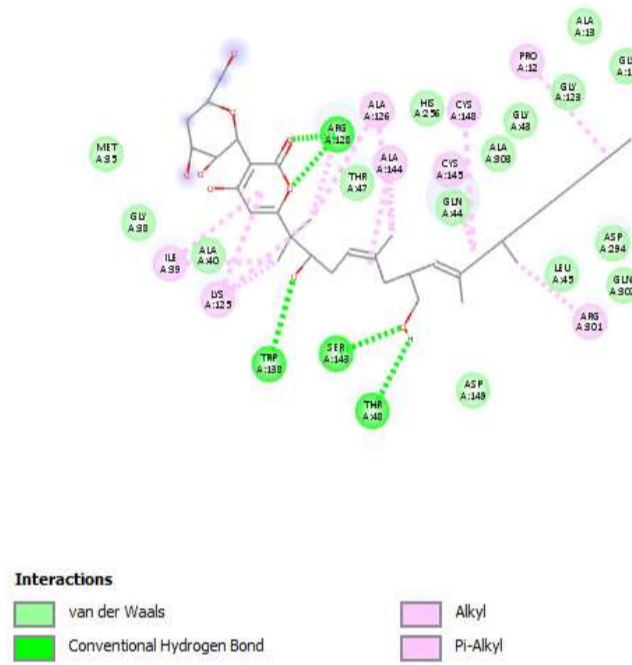
Ligand		Interaction hydrogène	Interaction hydrophobique	Interaction électrostatique	Interaction Van Der waals
Fongicide	Carpropamid	His83	Phe51, Phe51, Leu145, Pro147, Pro147, Phe156, Phe156, Ile149, Trp24, Leu74, Phe160, Tyr28, Val73, Val73, Leu167, Arg164	/	Asn129, Tyr48, Leu52, Ala68, His108, Val106, Gly163, Met67, Leu104,
Champignons	Camptothecin	Asn129	Val106, Phe156, Phe51, Phe51, His108, Val73, Val73, Val73, Tyr48, Tyr48, Leu167, His83, Arg164, Phe160, Phe160,	/	Tyr28, Leu145, Trp24, Leu104, Ser127, Pro147, Ile149, Ala125, Gly163, Leu74, Ala68, Met67, Gln166, Leu52,
	Griseofulvin	/	Phe51, Phe51, Phe156, Phe160, Phe160, Phe160, Val73, Val73, Leu167, Ala68, Met67, Tyr48, Tyr48, Phe64, Pro147, Leu145	/	Arg164, Gly163, Leu74, Thr81, His108, His83, Val106, Ile149, Trp24, Tyr28, Asn129, Ala72
	Huperzine A	Tyr48	Phe156, Phe156, Phe156, Ala68, Tyr28, Leu74, Val73, Phe51, Phe160, Phe160	/	Trp24, Leu145, Pro147, Ile149, Ala125, Val106, His108, His83, Phe64, Leu167
Actinomycète	Pentalenolactone	Tyr48, Tyr48	His83, His108, Val73, Phe156, Phe156, Phe51, Phe160, Phe160	/	Phe64, Arg164, Gly163, Leu167, Met67, Ala68, Leu74, Tyr28, Ile149, Pro147, Leu145

La scytalone déshydrogénase interagit avec le fongicide carpropamid en formant 26 interactions dont une liaison d'H avec His83, 16 interactions hydrophobiques avec Phe51, Phe51, Leu145, Pro147, Pro147, Phe156, Phe156, Ile149, Trp24, Leu74, Phe160, Tyr28, Val73, Val73, Leu167, Arg164, et 9 interactions de Van Der Waals. Pour les molécules d'origine fongique, la camptothecin forme avec l'enzyme 30 interactions dont 1 interaction hydrogène avec Asn129, 15 interactions hydrophobiques avec Val106, Phe156, Phe51, Phe51, His108, Val73, Val73, Val73, Tyr48, Tyr48, Leu167, His83, Arg164, Phe160, Phe160 et 14 interactions de Van Der Waals. La griseofulvin a formé 28 interactions dont 16 hydrophobiques (Phe51, Phe51, Phe156, Phe160, Phe160, Phe160, Val73, Val73, Leu167, Ala68, Met67, Tyr48, Tyr48, Phe64, Pro147, Leu145) et 12 Van Der Waals. L'huperzine A forme 21 interactions dont 1 hydrogène (Tyr48), 10 hydrophobiques (Phe156, Phe156, Phe156, Ala68, Tyr28, Leu74, Val73, Phe51, Phe160, Phe160) et 10 Van Der Waals. Pour les ligands actinomycétales, Le pentalenolactone a formé 21 interactions avec l'enzyme dont 2 interactions hydrogènes avec Tyr48, Tyr48, 8 interactions hydrophobiques avec His83, His108, Val73, Phe156, Phe156, Phe51, Phe160, Phe160 et 11 interactions de Van Der Waals.

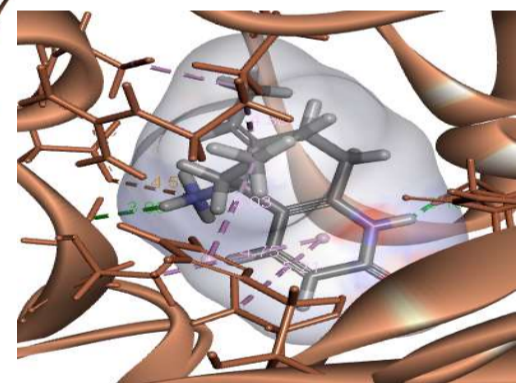
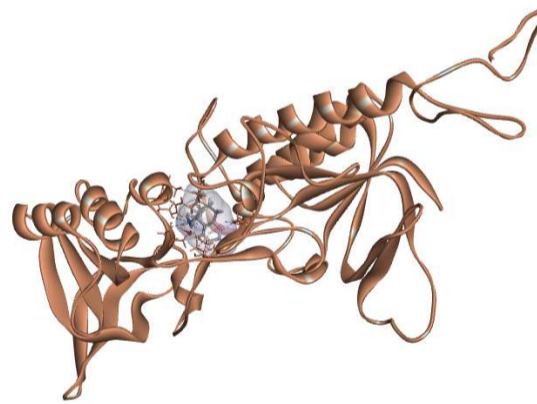
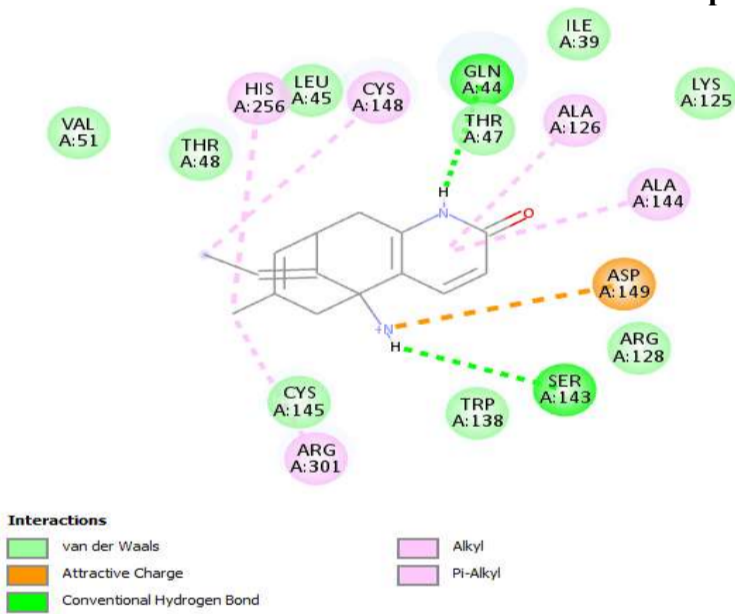
Pour la thioredoxine réductase, nous avons choisi les ligands fongiques (Bassianin, Fusapyrone, Huperzine A, Lovastatine, Mevinlon) et ligands actinomycétales (Diazepinomicin, Hygromycin, Lomofungin, Polyoxin B et Transvalencin) (Figure 54, Tableau 35).



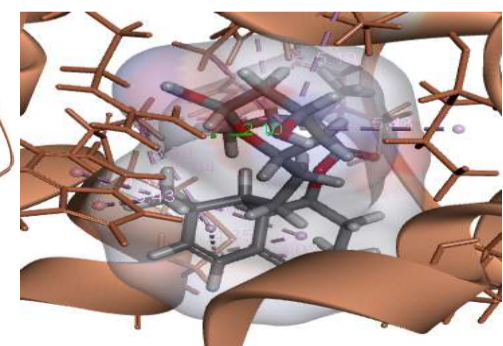
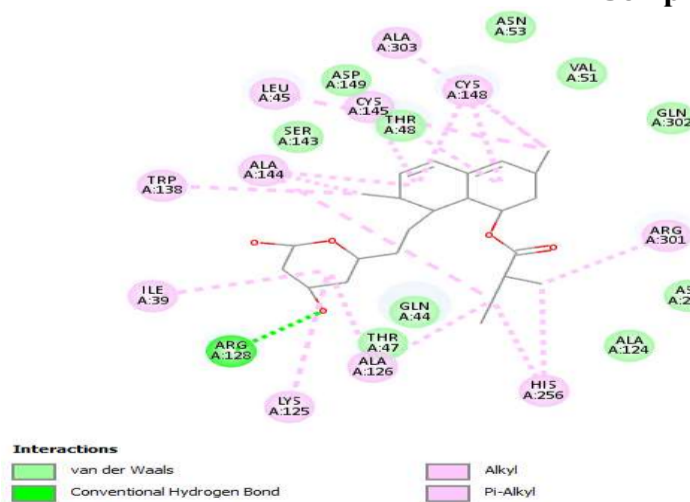
Complexe : thioredoxin réductase - ligand Bassianin



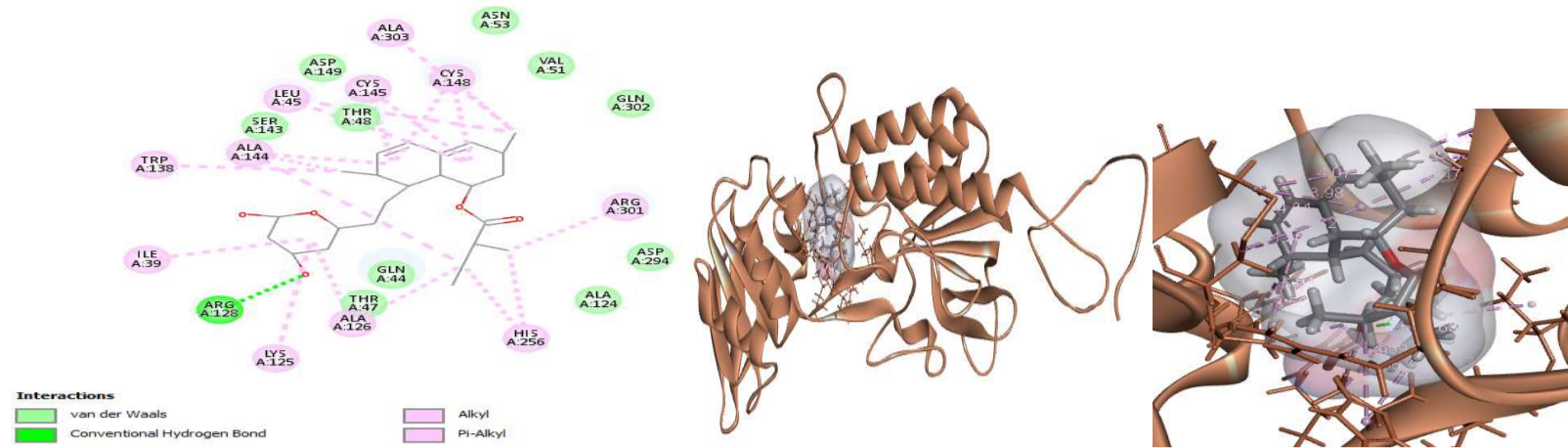
Complexe : thioredoxin réductase - ligand Fusapyrone



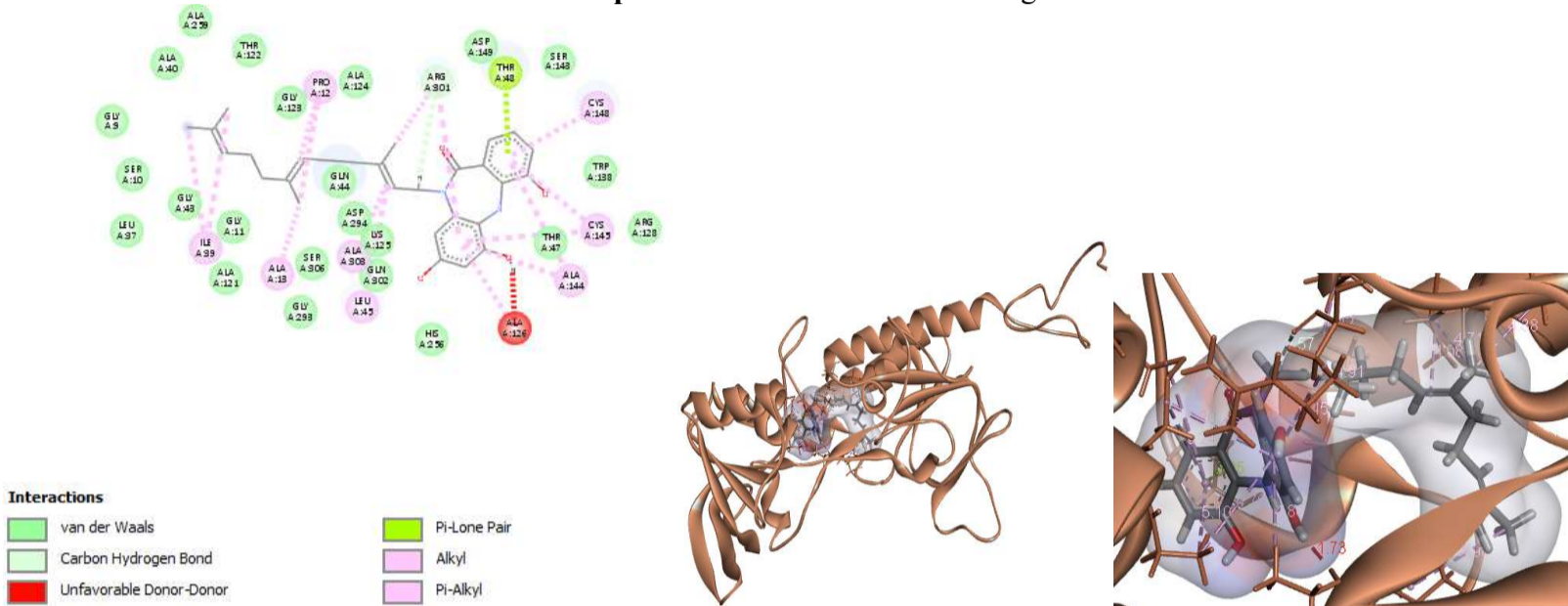
Complexe : thioredoxin réductase - ligand Huperzine A



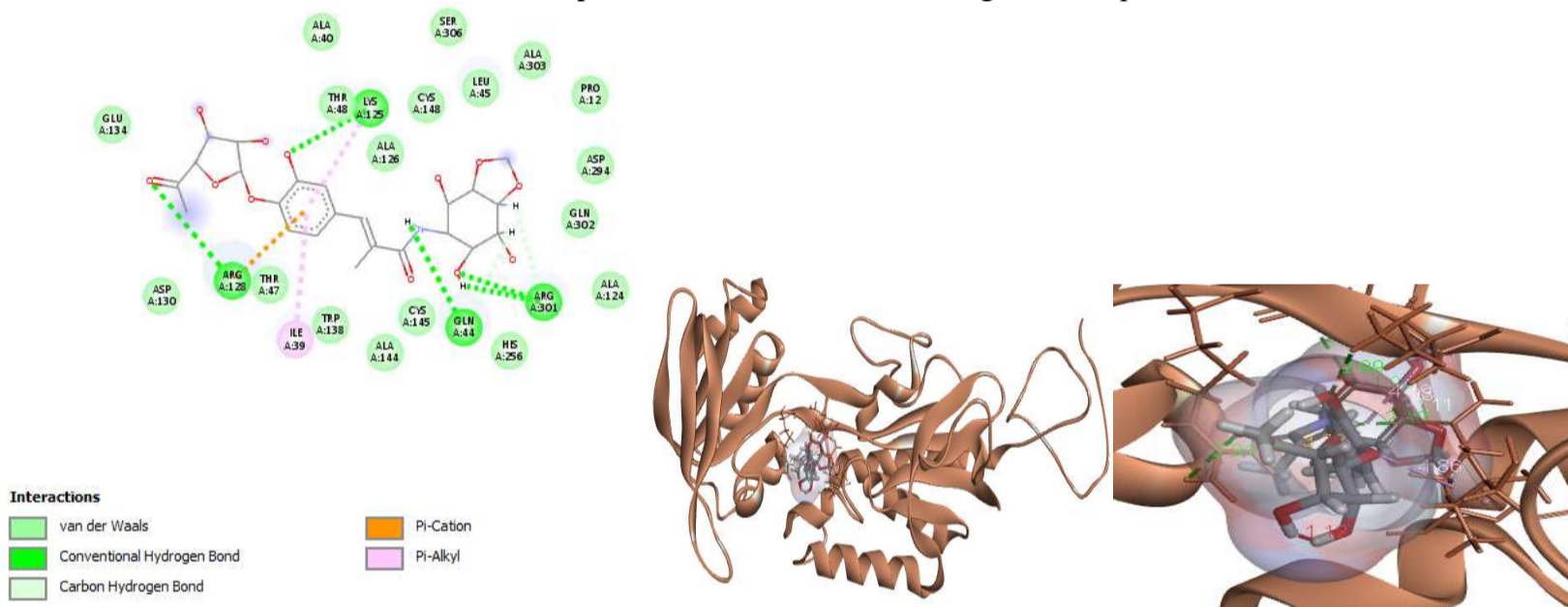
Complexe : thioredoxin réductase - ligand Lovastatine



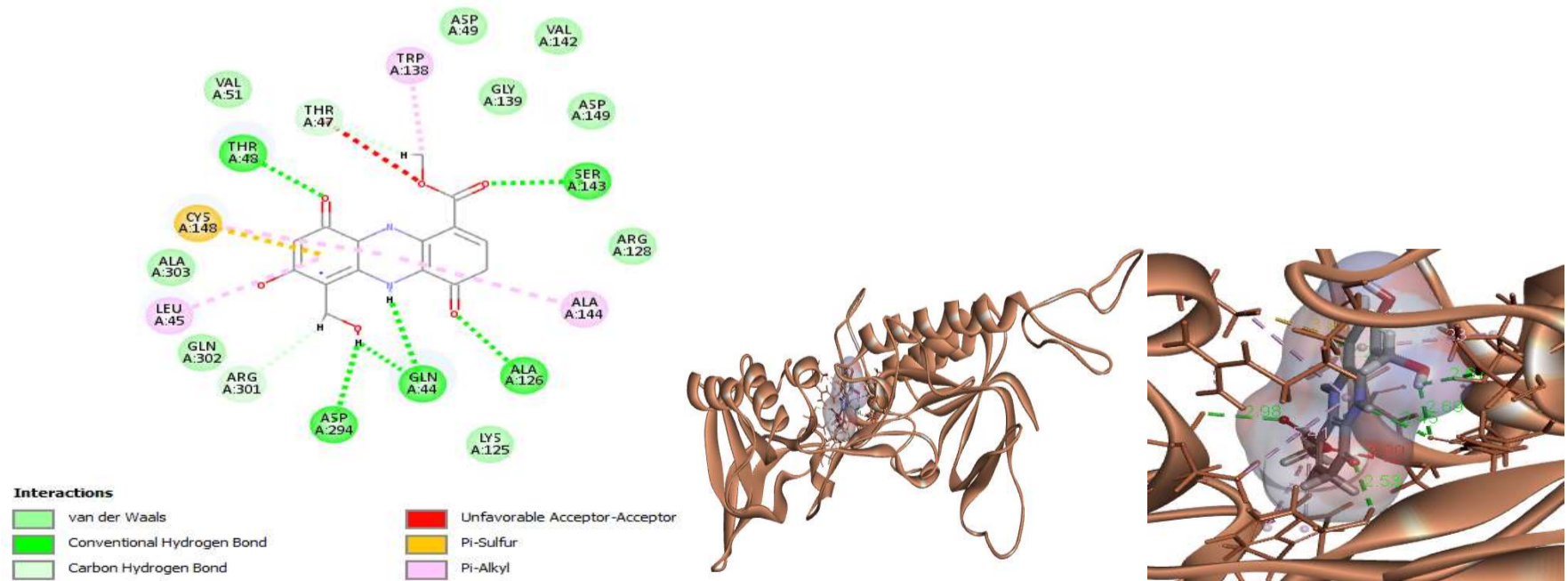
Complexe : thioredoxin réductase - ligand Mevinlon



Complexe : thioredoxin réductase - ligand Diazepinomicin



Complexe : thioredoxin réductase - ligand Hygromycin



Complexe : thioredoxin réductase - ligand Lomofungin

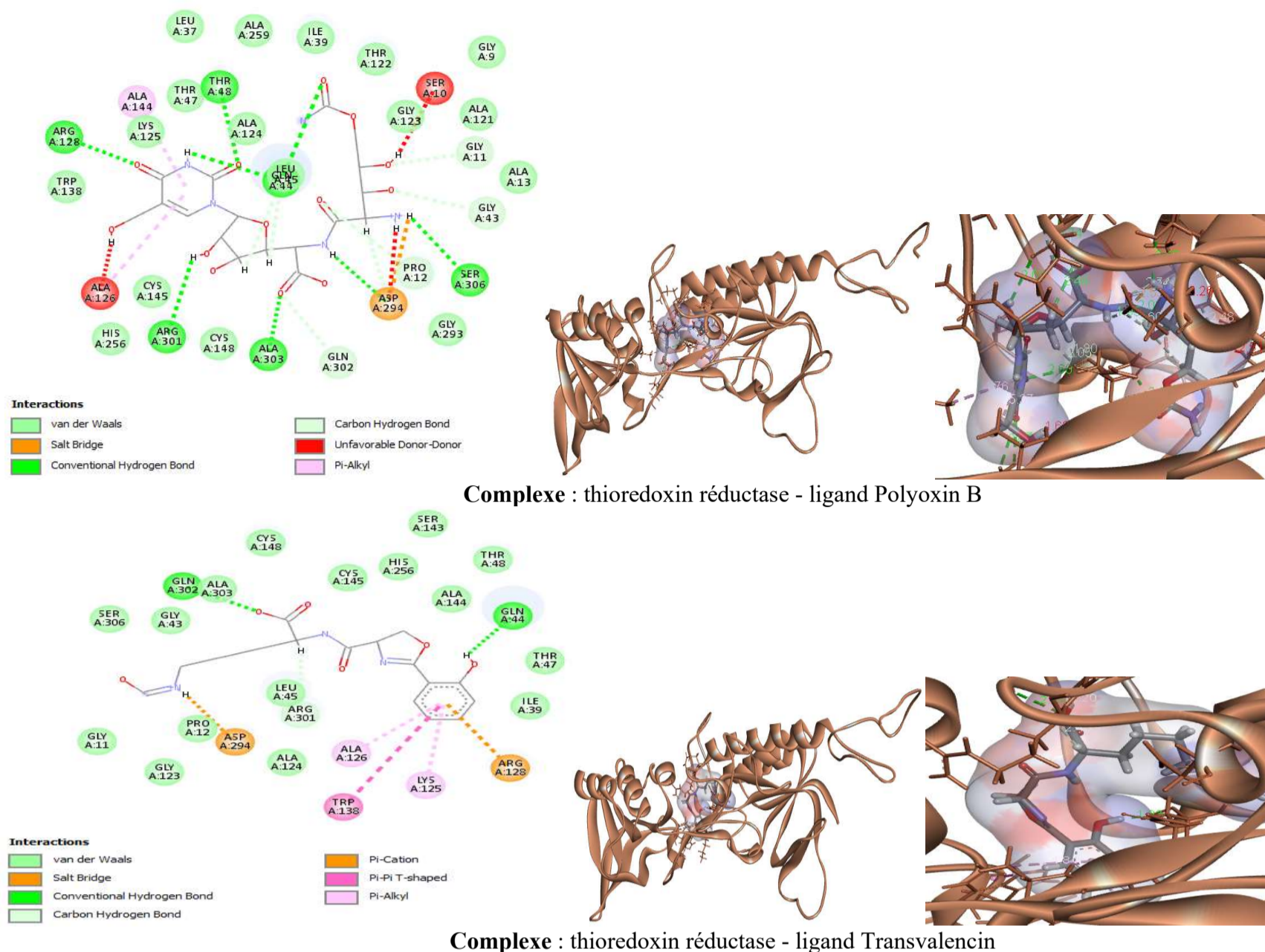


Figure 54. Illustrations 2D et 3D des interactions entre la thioredoxin réductase et ses meilleurs ligands

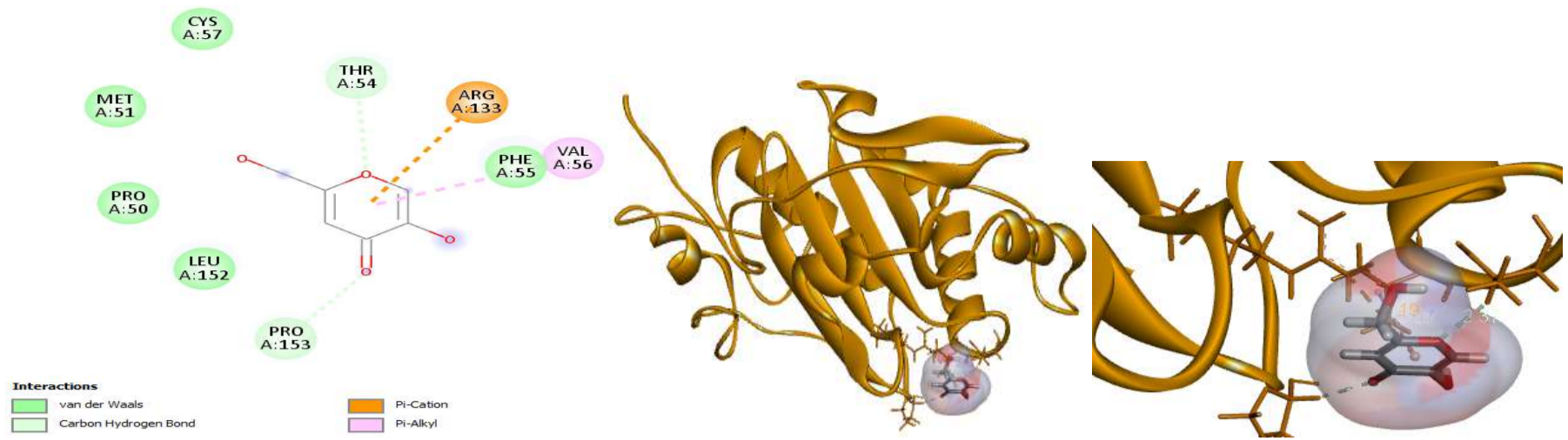
Tableau 35. Types d'interactions entre le récepteur thioredoxin réductase et les meilleurs ligands fongiques et actinomycétales.

	Ligand	Interaction hydrogène	Interaction hydrophobique	Interaction électrostatique	Interaction Van Der waals
Champignons	Bassianin	Thr48	Pro12, Pro12, Pro12, Leu45, Ala144, Ala144, Cys145, Ala126, Trp138, Lys125, Ala303	Cys148, Arg128	Ser143, Asp149, Gly43, Ser306, Gly11, Ala121, Gly123, Gly293, Ala13, Asp294, Gln44, Arg301, Ile39, His256, Thr47, Gln302, Gly14, Ala124,
	Fusapyrone	Arg128, Arg128, Trp138, Thr48, Ser143	Ile39, Ile39, Lys125, Lys125, Lys125, Ala126, Ala126, Ala144, Cys145, Pro12, Cys148, Arg301	/	Asp149, Gln302, Leu45, Ser306, Ala303, Asp294, Gly11, Gly43, Gly123, Met35, Gly38, Ala40, Gln44, Thr47, Ala13, His256, Ala124
	Huperzine A	Ser143, Gln44	Ala126, Ala144, His256, Arg301, Cys148	Asp149	Val51, Cys145, Trp138, Arg128, Lys125, Ile39, Thr47, Leu45, Thr48
	Lovastatine	Arg128	His256, His256, Arg301, Ala303, Cys148, Leu45, Cys148, Cys145, Cys148, Cys145, Trp138, Ala144, Ala144, Ala144, Ile39, Lys125, Ala126, Ala126	/	Gln302, Ala124, Asp294, Thr47, Gln44, Ser143, Thr48, Asp149, Val51, Asn53,
	Mevinlon	Arg128	Ala126, Ala126, Arg301, Ala303, Cys148, Cys148, Cys148, Leu45, Leu45, Cys145, Cys145, Trp138, Ala144, Ala144, Ala144, Ile39, Lys125, His256, His256	/	Gln302, Ala124, Asp294, Asp149, Thr48, Ser143, Thr47, Gln44, Val51, Asn53
Actinomyc	Diazepinomicin	Arg301,	Ala126, Pro12, Pro12, Ile39, Ile39, Ala13, Leu45, Ala303, Arg301, Arg301, Cys148,	/	Ser10, Gly11, Gly43, Thr122, Gly123, Ala124, Gly293, Ser306, Asp294, Gln44, His256, Gln302, Lys125,

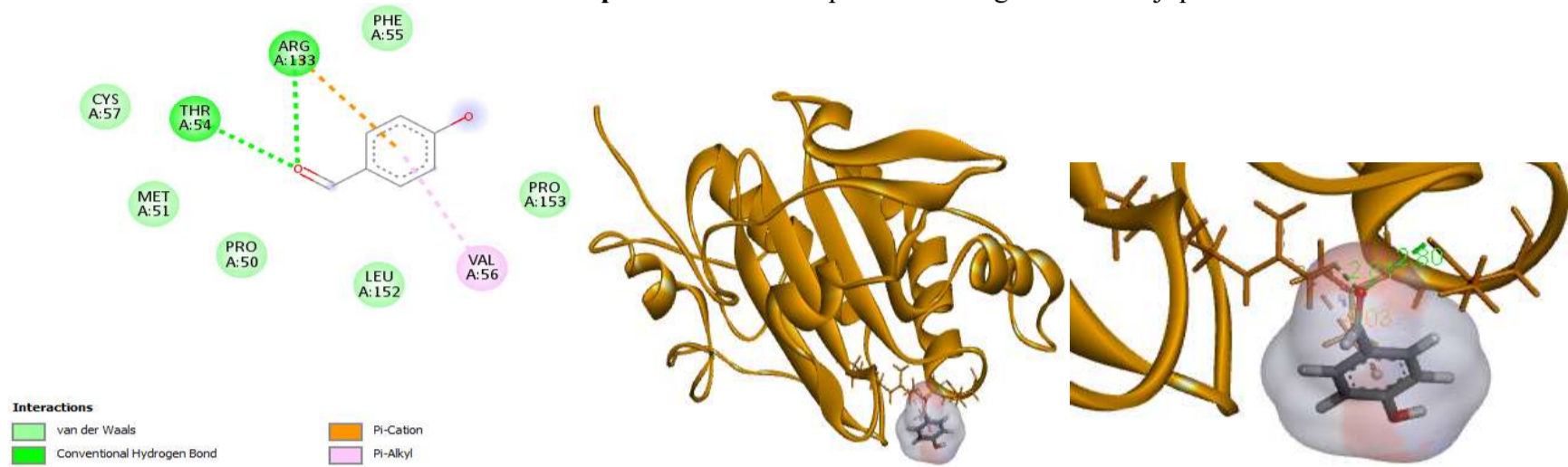
		Ala144, Ala144, Cys145, Cys145		Thr47, Trp138, Ser143, Asp149, Arg128, Ala259, Ala40, Gly9, Leu37, Ala121
Hygromycin	Arg128, Gln44, Lys125, Gln44, Arg301, Arg301, Arg301	Ile39, Lys125	Arg128	Ala124, Gln302, Asp294, Leu45, Ala303, Cys145, Cys148, Ala144, Thr48, Ala126, Trp138, Asp130, Glu134, His256, Thr47, Pro12, Ser306, Ala40
Lomofungin	Thr48, Ser143, Ala126, Gln44, Gln44, Asp294, Arg301, Thr47	Cys148, Leu45, Ala144, Trp138	Cys148	Val51, Asp49, Gly139, Asp149, Arg128, Lys125, Gln302, Ala303, Val142
Polyoxin B	Arg128, Thr48, Arg301, Ala303, Asp294, Gln44, Gln44, Ser306, Gly43, Gly11, Gln302, Asp294, Pro12	Ala144, Ala126	Asp294	Cys148, Cys145, Thr47, Trp138, Leu45, Ala13, Gly293, Lys125, Leu37, Thr122, Ile39, Ala259, Ala124, Gly123, Gly9, Ala121
Transvalencin	Gln44, Gln302, Arg301	Ala126, Trp138, Lys125	Asp294, Arg128	Ile39, Thr47, Ala144, Cys145, Cys148, Ala303, Ser306, Pro12, Gly43, Gly123, Leu45, Ala124, His256, Thr48, Gly11, Ser143

Avec les métabolites fongiques, la thioredoxin réductase a formé avec Bassianin 32 interactions dont une liaison d'H avec l'acide aminé Thr48, 11 interactions hydrophobiques avec Pro12, Pro12, Pro12, Leu45, Ala144, Ala144, Cys145, Ala126, Trp138, Lys125, Ala303, 2 interactions électrostatiques (Cys148, Arg128) et 18 interactions de Van Der Waals. Le fusapyrone forme avec l'enzyme 34 interactions dont 5 interactions hydrogènes avec Arg128, Arg128, Trp138, Thr48, Ser143, 12 interactions hydrophobiques avec Ile39, Ile39, Lys125, Lys125, Lys125, Ala126, Ala126, Ala144, Cys145, Pro12, Cys148, Arg301 et 17 interactions de Van Der Waals. L'huperzine A forme 17 interactions dont 2 hydrogènes (Ser143, Gln44), 5 hydrophobiques (Ala126, Ala144, His256, Arg301, Cys148), 1 hydrophobique (Asp149) et 9 Van Der Waals. La lovastatine forme 29 interactions dont 1 hydrogène (Arg128), 18 hydrophobiques (His256, His256, Arg301, Ala303, Cys148, Leu45, Cys148, Cys145, Cys148, Cys145, Trp138, Ala144, Ala144, Ala144, Ile39, Lys125, Ala126, Ala126) et 10 Van Der Waals. Le mevinlon forme avec le thioredoxin réductase 30 interactions dont 1 interaction hydrogène (Arg128), 19 hydrophobiques (Ala126, Ala126, Arg301, Ala303, Cys148, Cys148, Cys148, Leu45, Leu45, Cys145, Cys145, Trp138, Ala144, Ala144, Ala144, Ile39, Lys125, His256, His256) et 10 interactions de Van Der Waals. Pour les ligands actinomycétales, la diazepinomicin a formé 39 interactions avec l'enzyme dont 1 interaction hydrogène avec Arg301, 15 interactions hydrophobiques Ala126, Pro12, Pro12, Ile39, Ile39, Ala13, Leu45, Ala303, Arg301, Arg301, Cys148, Ala144, Ala144, Cys145, Cys145 et 23 interactions de Van Der Waals. L'hygromycin forme 28 interactions dont 7 interactions hydrogènes avec Arg128, Gln44, Lys125, Gln44, Arg301, Arg301, Arg301, 2 interactions hydrophobiques avec Ile39, Lys125, 1 interaction électrostatique avec Arg128 et 18 interactions de Van Der Waals. La lomofungin a formé 22 interactions dont 8 interactions hydrogènes (Thr48, Ser143, Ala126, Gln44, Gln44, Asp294, Arg301, Thr47), 4 interactions hydrophobiques (Cys148, Leu45, Ala144, Trp138), 1 interaction électrostatique (Cys148) et 9 interactions de Van Der Waals. La polyoxin B a formé avec cette enzyme 32 interactions dont 13 interactions hydrogènes (Arg128, Thr48, Arg301, Ala303, Asp294, Gln44, Gln44, Ser306, Gly43, Gly11, Gln302, Asp294, Pro12), 2 interactions hydrophobiques (Ala144, Ala126), 1 interaction électrostatique (Asp294) et 16 interactions de Van Der Waals. La transvalencin forme 24 interactions dont 3 interactions hydrogènes (Gln44, Gln302, Arg301), 3 interactions hydrophobiques (Ala126, Trp138, Lys125), 2 interactions électrostatiques (Asp294, Arg128) et 16 interactions de Van Der Waals.

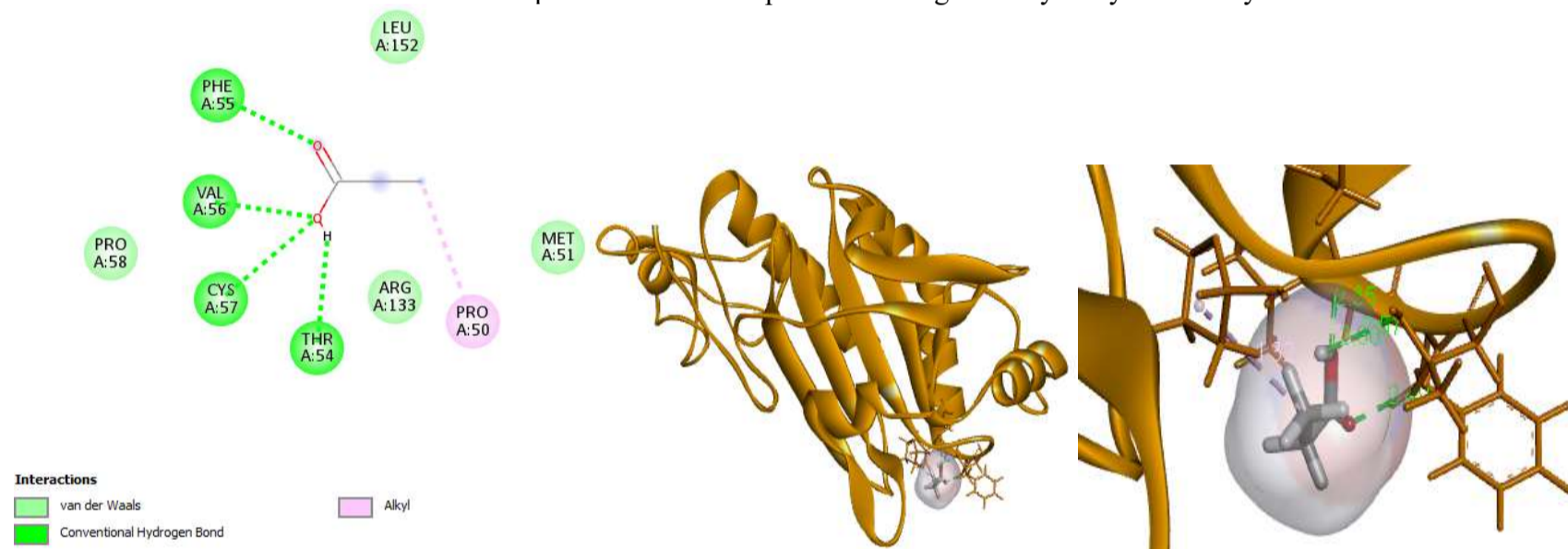
Pour le thioredoxin peroxidase, nous avons choisi les ligands fongiques (l'acide kojique, P-hydroxybenzaldehyde, acide propionique, Tyrosol, Xanthone) et des ligands actinomycétales (Cycloserine, 8-Hydroxyquinoline, acide indole-3-carboxylique, Phenylacetate et acide 3-Phenylpropionique) (**Figure 55, Tableau 36**).



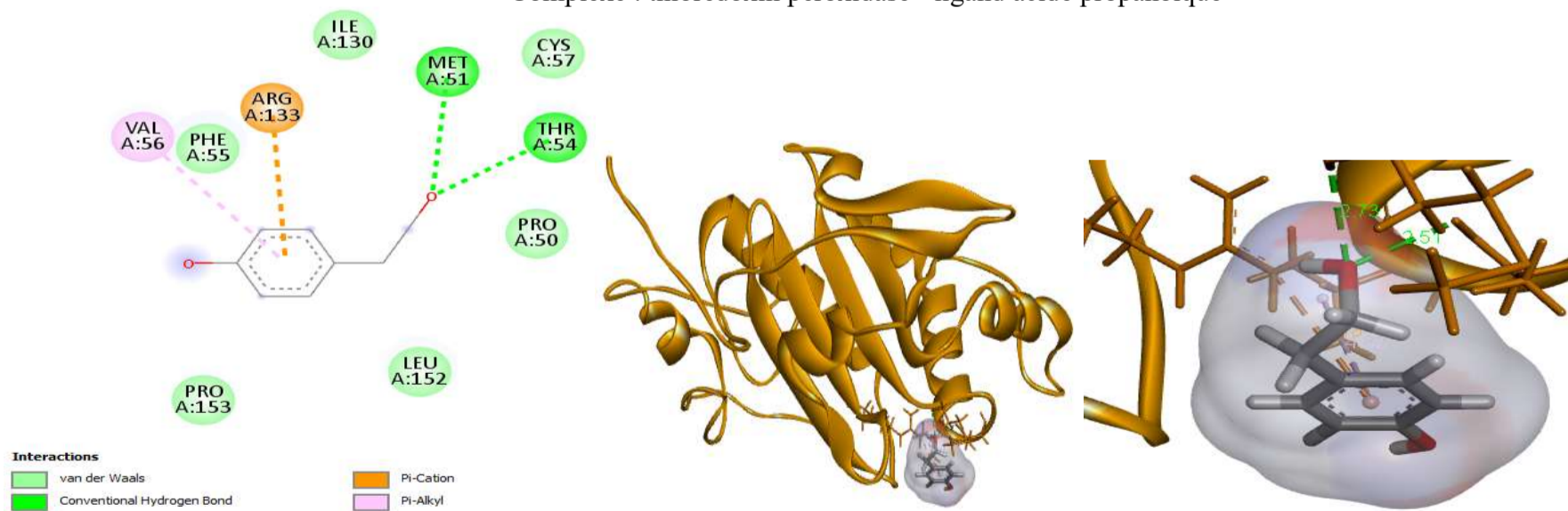
Complexe : thioredoxin peroxidase - ligand acide kojique



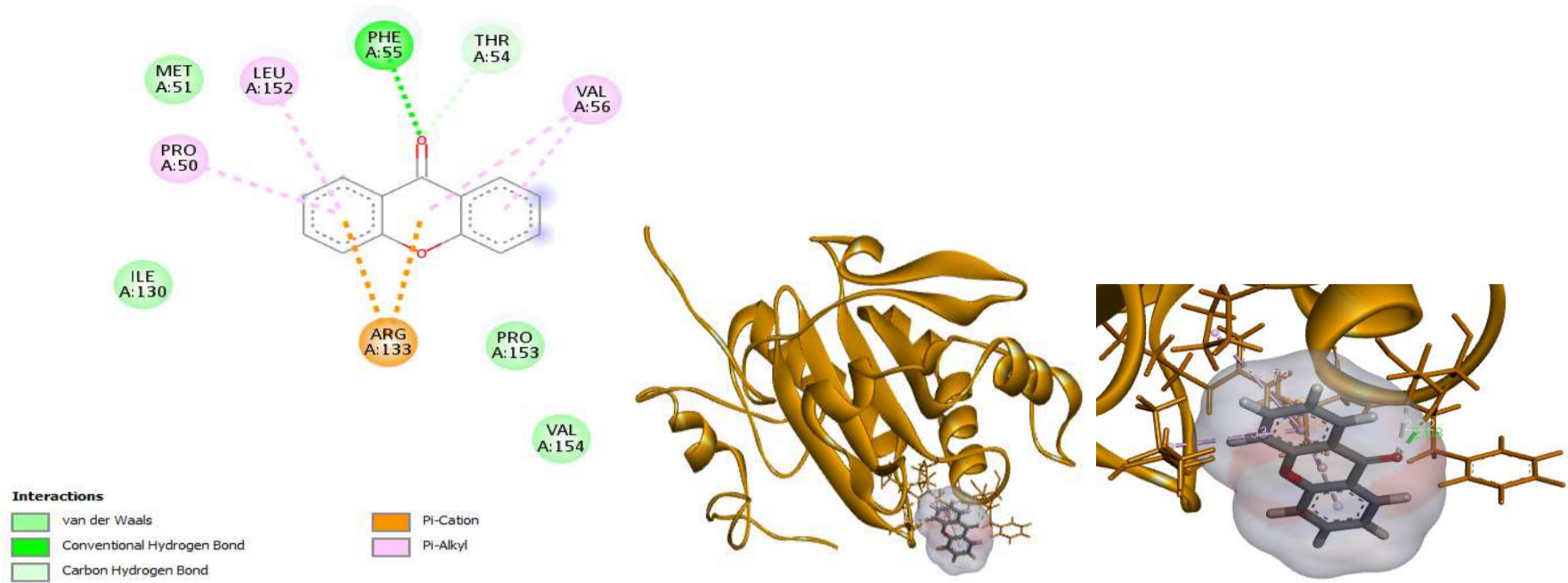
Complexe : thioredoxin peroxidase - ligand P-hydroxybenzaldehyde



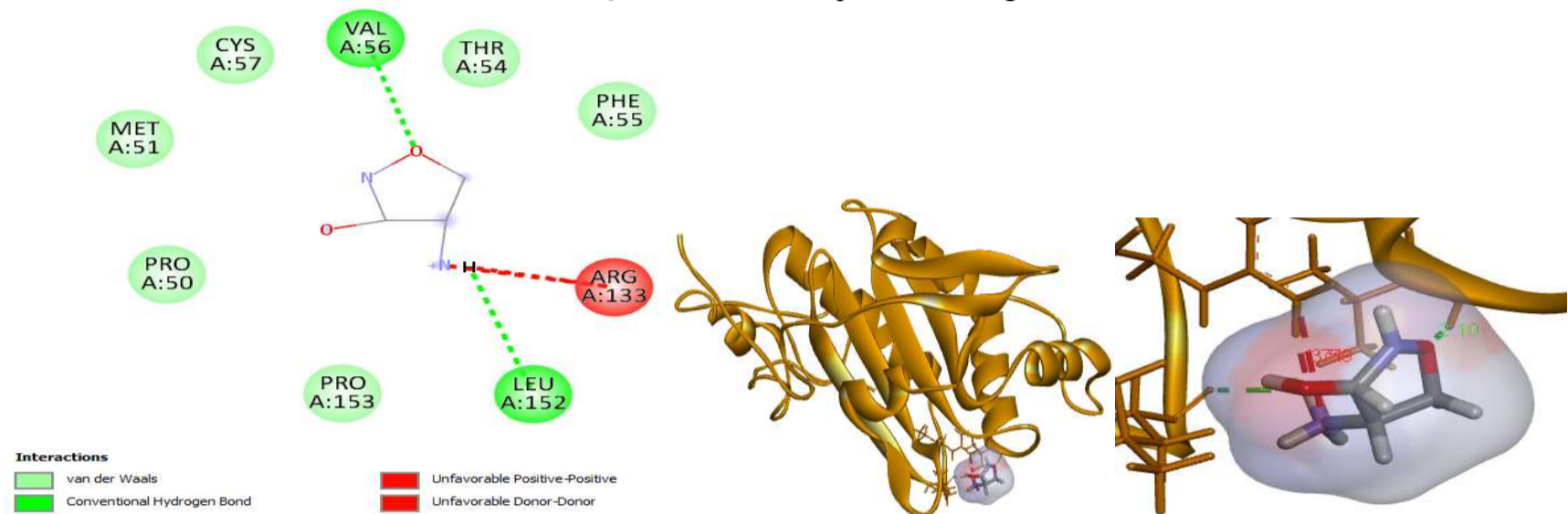
Complexe : thioredoxin peroxidase - ligand acide propanoïque



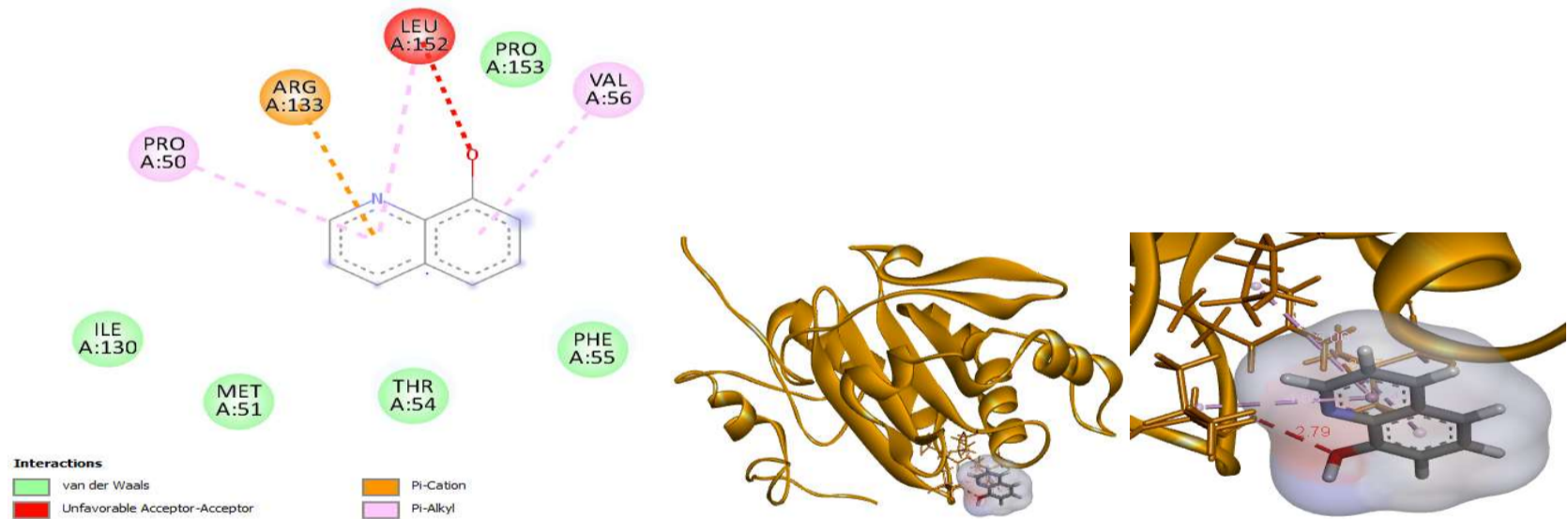
Complexe : thioredoxin peroxidase - ligand Tyrosol



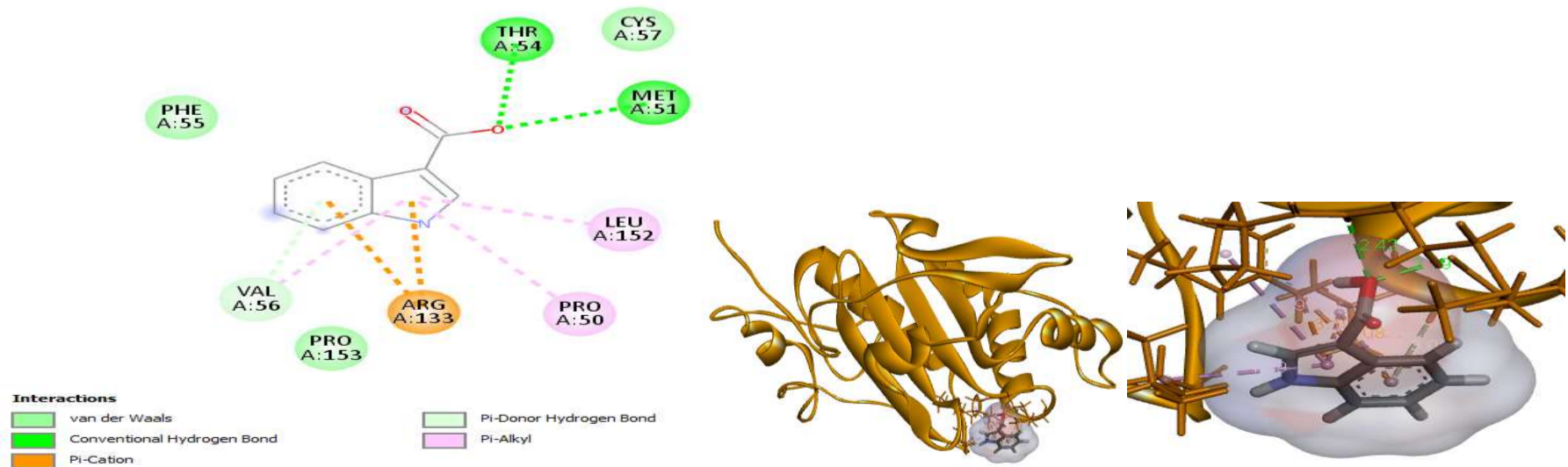
Complexe : thioredoxin peroxidase - ligand Xanthone



Complexe : thioredoxin peroxidase - ligand Cycloserine



Complexe : thioredoxin peroxidase - ligand 8-Hydroxyquinoline



Complexe : thioredoxin peroxidase - ligand acide indole-3-carboxylique

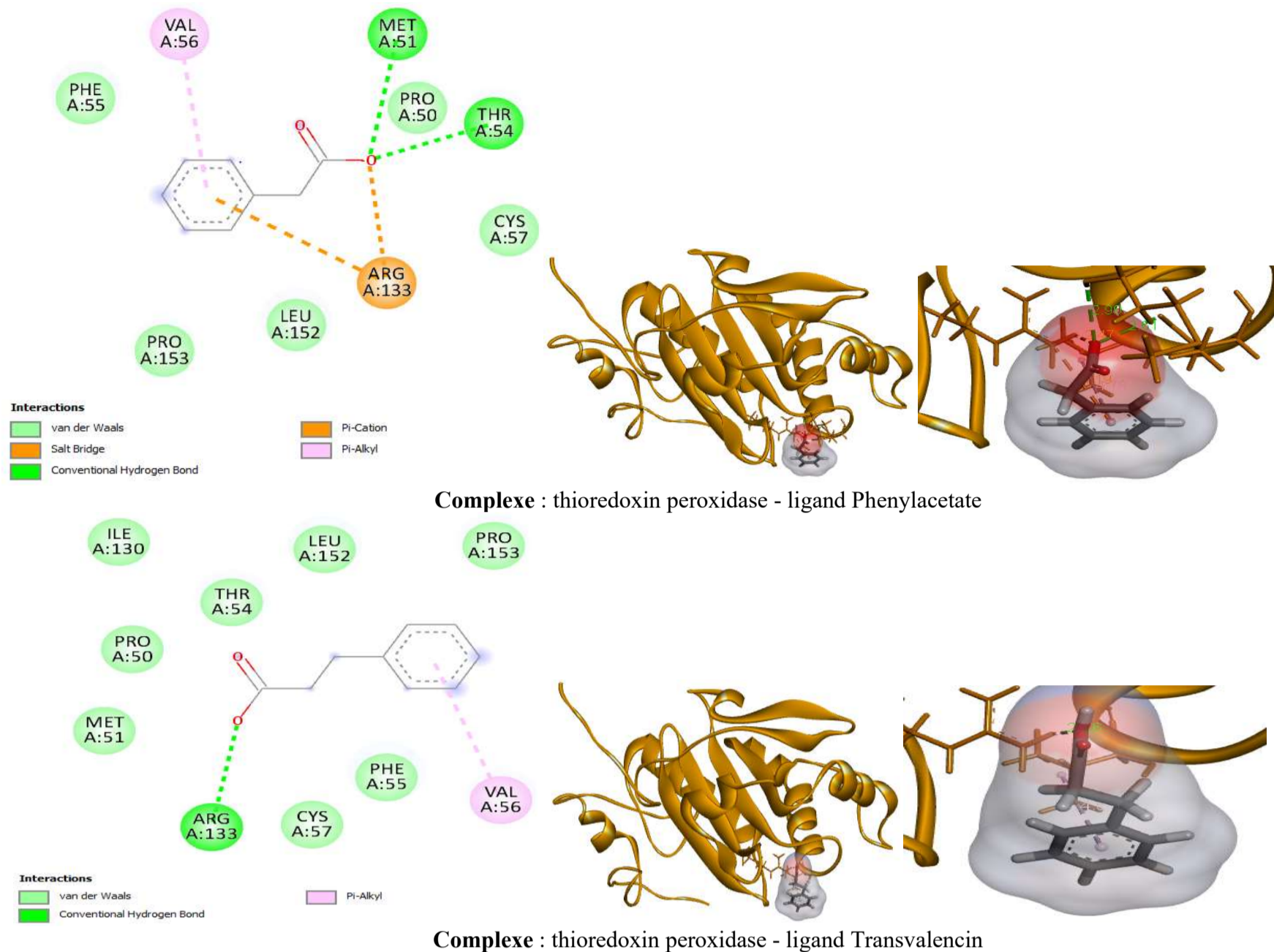


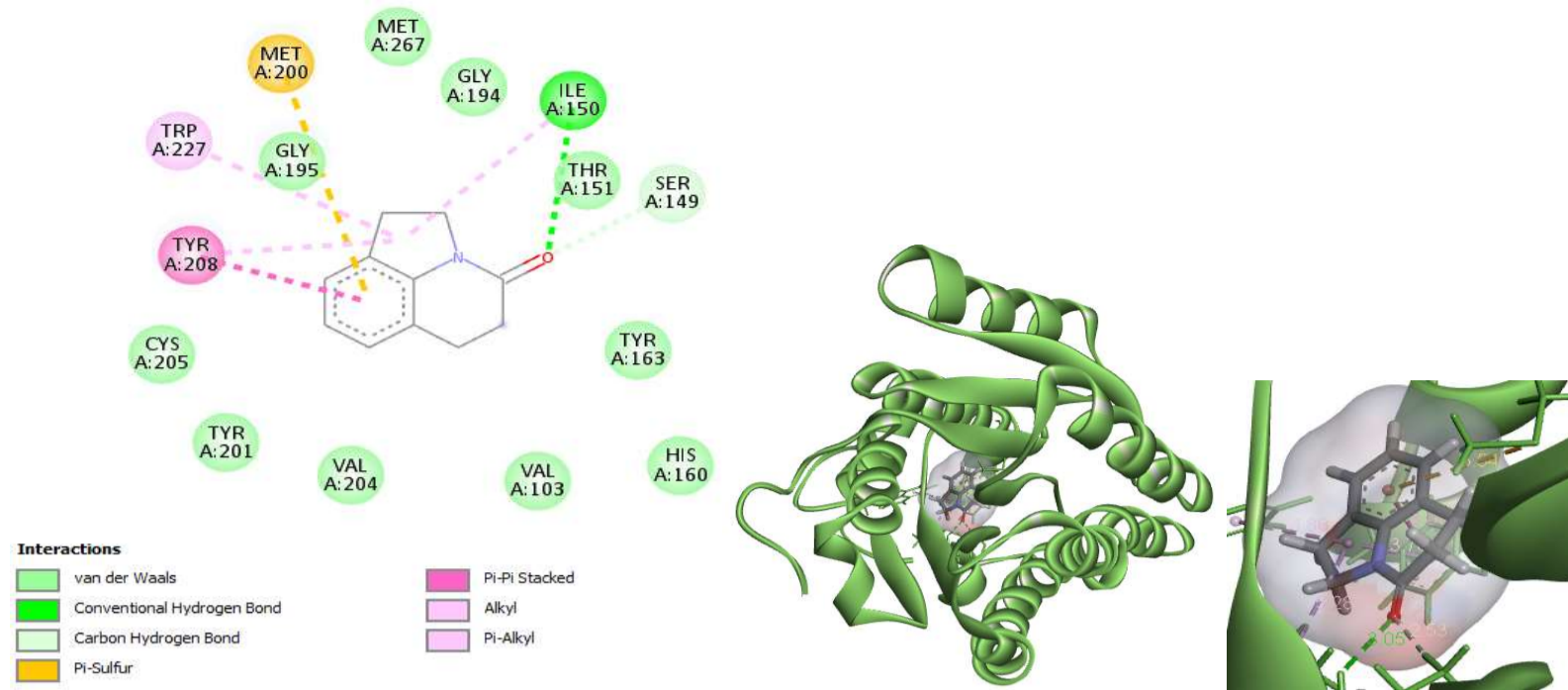
Figure 55. Illustrations 2D et 3D des interactions entre la thioredoxin peroxidase et ses meilleurs ligands

Tableau 36. Différents types d'interactions entre le récepteur thioredoxin peroxidase et les meilleurs ligands fongiques et actinomycétales.

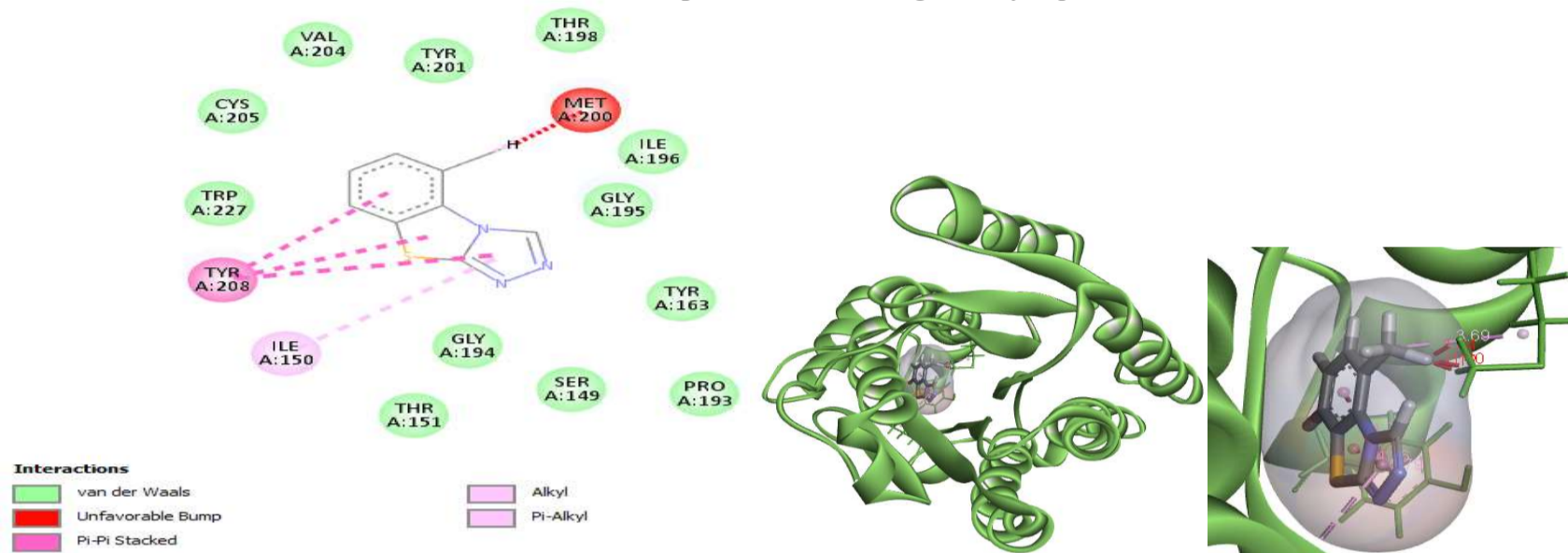
	Ligand	Interaction hydrogène	Interaction hydrophobique	Interaction électrostatique	Interaction Van Der waals
Champignons	Acide kojique	Thr54, Pro153	Val56	Arg133	Phe55, Leu152, Cys57, Pro50, Met51
	P-hydroxybenzaldehyde	Arg133, Thr54	Val56	Arg133	Phe55, Pro153, Leu152, Cys57, Met51, Pro50
	Acide propanoïque	Phe55, Cys57, Val56, Thr54	Pro50	/	Pro58, Arg133, Met51, Leu152
	Tyrosol	Thr54, Met51	Val56	Arg133	Leu152, Pro153, Phe55, Cys57, Pro50, Ile130
	Xanthone	Phe55, Thr54	Val56, Val56, Pro50, Leu152	Arg133, Arg133	Met51, Pro153, Val154, Ile130
Actinomycètes	Cycloserine	Val56, Leu152	/	/	Pro50, Pro153, Met51, Thr54, Cys57, Phe55
	8-Hydroxyquinoline	/	Leu152, Pro50, Val56	Arg133	Met51, Thr54, Phe55, Pro153, Ile130
	Acide indole-3-carboxylique	Val56, Met51, Thr54	Val56, Pro50, Leu152	Arg133, Arg133	Cys57, Phe55, Pro153
	Phenylacetate	Met51, Thr54	Val56	Arg133, Arg133	Pro50, Cys57, Leu152, Pro153, Phe55
	Acide 3-Phenylpropionique	Arg133	Val56	/	Leu152, Thr54, Cys57, Pro50, Met51, Ile130, Phe55, Pro153

Dans la catégorie les métabolites fongique, l'enzyme thioredoxin peroxidase a formé avec l'acide kojique 9 interactions dont deux liaisons d'H avec Thr54, Pro153, 1 interaction hydrophobique avec Val56, 1 interaction électrostatique (Arg133) et 5 interactions de Van Der Waals avec Phe55, Leu152, Cys57, Pro50, Met51. Avec la P-hydroxybenzaldehyde, l'enzyme a établie 10 interactions dont 2 interactions hydrogènes avec Arg133, Thr54, 1 interaction hydrophobique avec Val56 et 1 interaction électrostatique (Arg133) et 6 interactions de Van Der Waals. L'acide propanoïque forme 9 interactions dont 4 hydrogènes (Phe55, Cys57, Val56, Thr54), 1 hydrophobique (Pro50), et 4 Van Der Waals (Pro58, Arg133, Met51, Leu152). Le Tyrosol forme 10 interactions dont 2 hydrogènes (Thr54, Met51) 1 hydrophobique (Val56), 1 interaction électrostatique (Arg133) et 6 Van Der Waals. Le Xanthone forme avec le thioredoxin peroxidase 12 interactions dont 2 interactions hydrogènes (Phe55, Thr54), 4 hydrophobiques (Val56, Val56, Pro50, Leu152), 2 interactions électrostatiques (Arg133, Arg133) et 4 interactions de Van Der Waals (Met51, Pro153, Val154, Ile130). Pour les ligands actinomycétales, la cycloserine a formé 8 interactions avec l'enzyme dont 2 interactions hydrogènes avec Val56, Leu152, et 6 interactions de Van Der Waals : Pro50, Pro153, Met51, Thr54, Cys57, Phe55. La 8-Hydroxyquinoline forme 9 interactions dont 3 interactions hydrophobiques avec Leu152, Pro50, Val56, 1 interaction électrostatique avec Arg133 et 5 interactions de Van Der Waals avec Met51, Thr54, Phe55, Pro153, Ile130. L'acide indole-3-carboxylique a formé 11 interactions dont 3 interactions hydrogènes (Val56, Met51, Thr54), 3 interactions hydrophobiques (Val56, Pro50, Leu152), 2 interactions électrostatiques (Arg133, Arg133) et 3 interactions de Van Der Waals (Cys57, Phe55, Pro153). La phenylacetate a formé par cet enzyme 10 interactions dont 2 interactions hydrogènes (Met51, Thr54), 1 interaction hydrophobique (Val56), 2 interactions électrostatiques (Arg133, Arg133) et 5 interactions de Van Der Waals (Pro50, Cys57, Leu152, Pro153, Phe55). L'acide 3-Phenylpropionique forme 10 interactions dont 1 hydrogène (Arg133), 1 hydrophobique (Val56) et 8 de Van Der Waals.

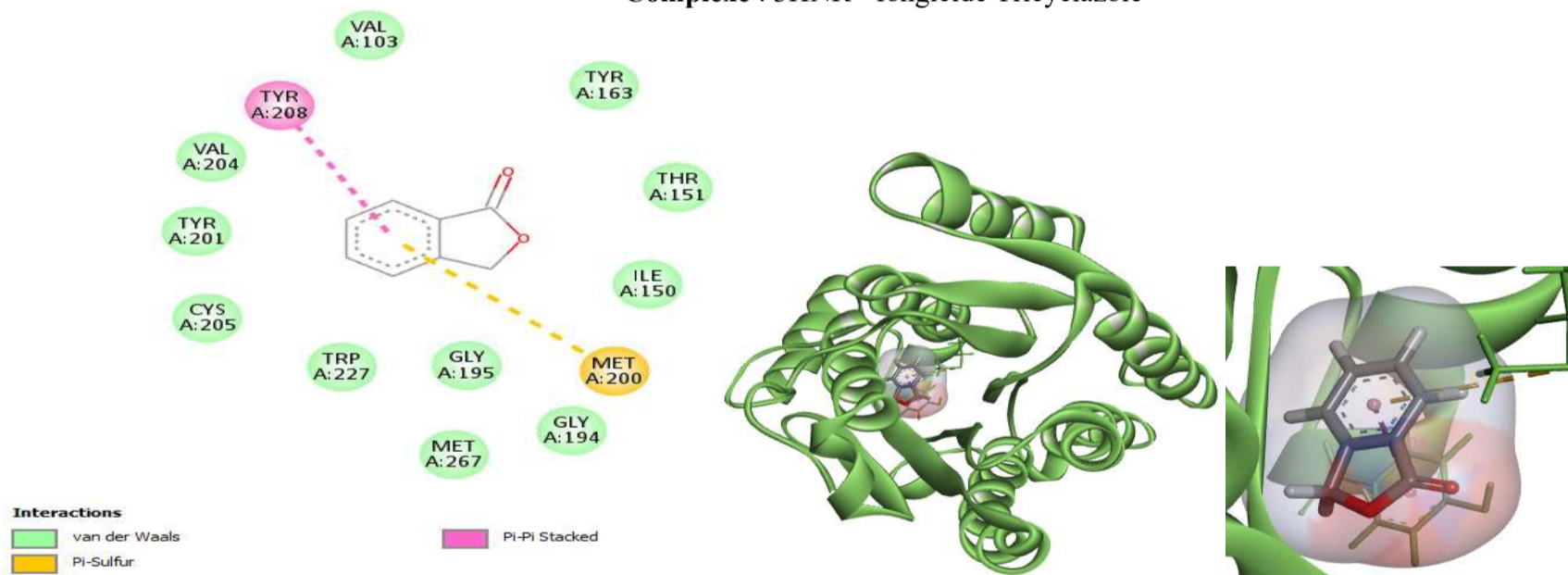
Pour 3HNR, nous avons choisi les ligands fongiques (Phenylethyl alcool, P-hydroxybenzaldehyde et Tyrosol) et ligands actinomycétales (8-Hydroxyquinoline, acide indole-3-carboxylique, Phenylacetate, acide 3-Phenylpropionique et Streptokordin) (Figure 56, Tableau 37).



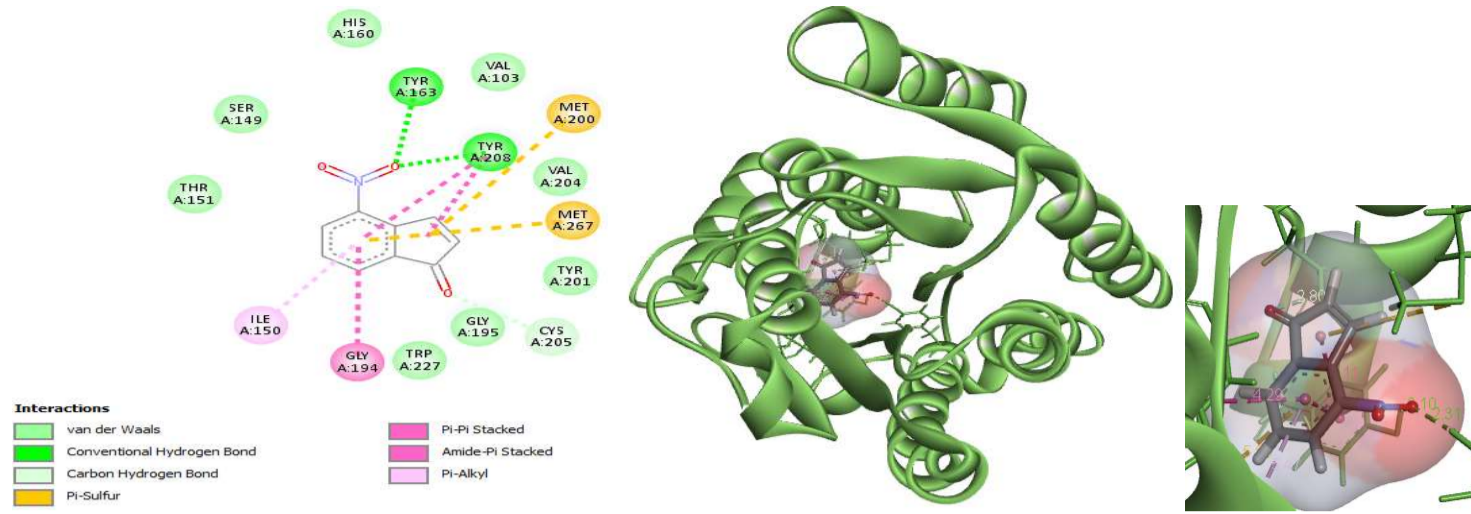
Complexe : 3HNR - fongicide Pyroquillon



Complexe : 3HNR - fongicide Tricyclazole



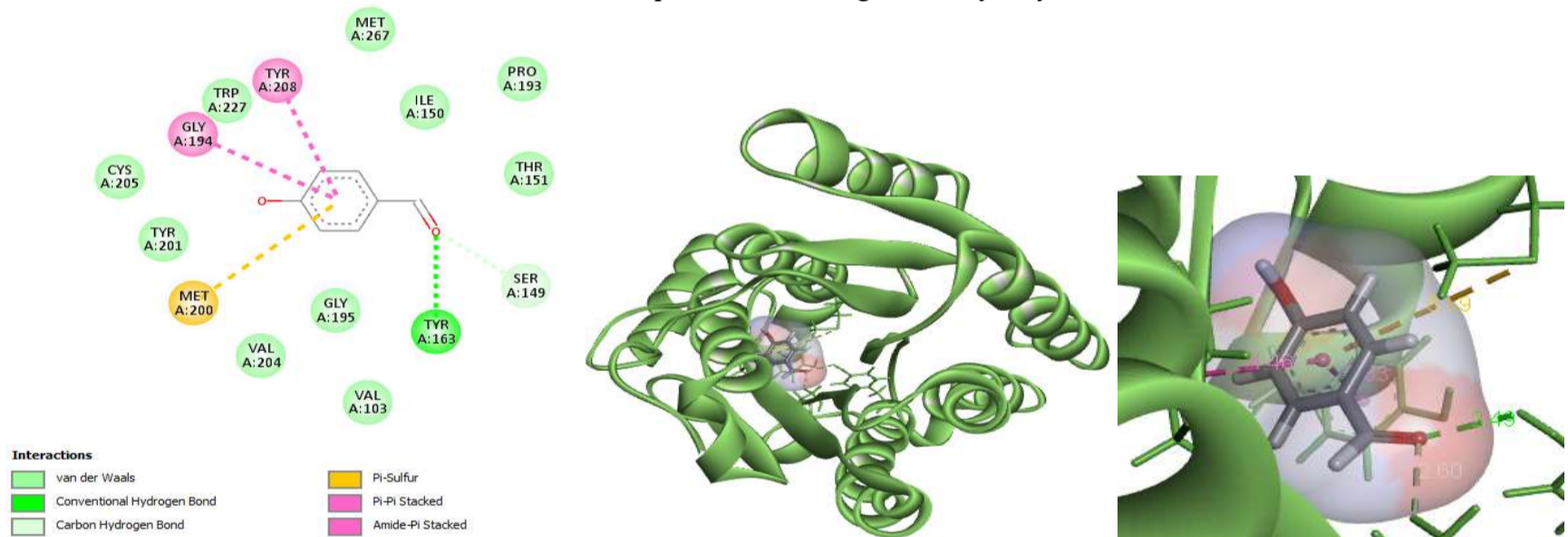
Complexe : 3HNR - fongicide Phthalide



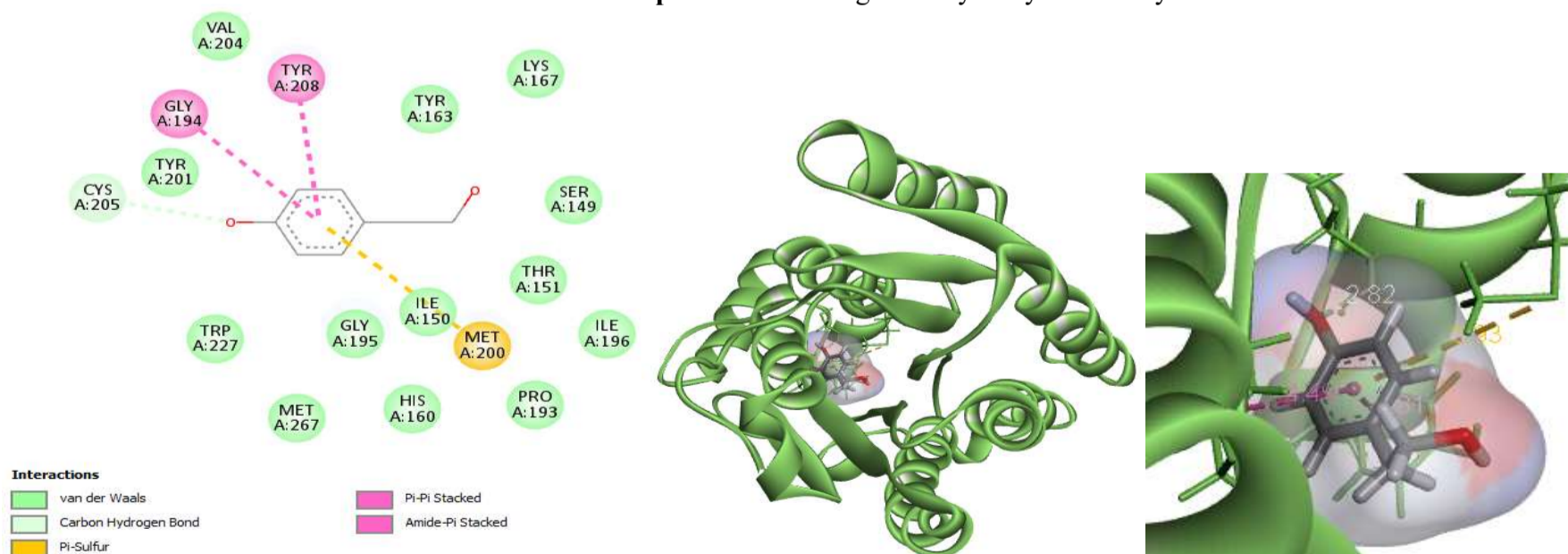
Complexe: 3HNR - fongicide 4-nitro - inden-1- one



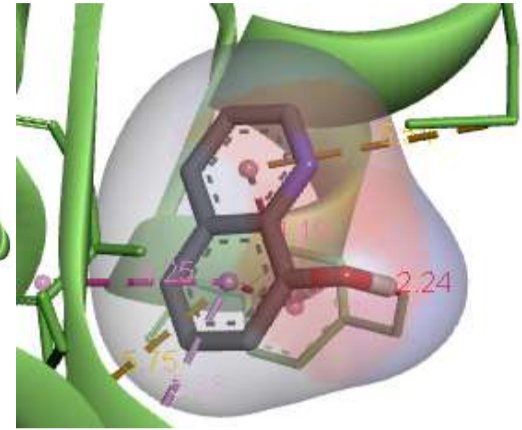
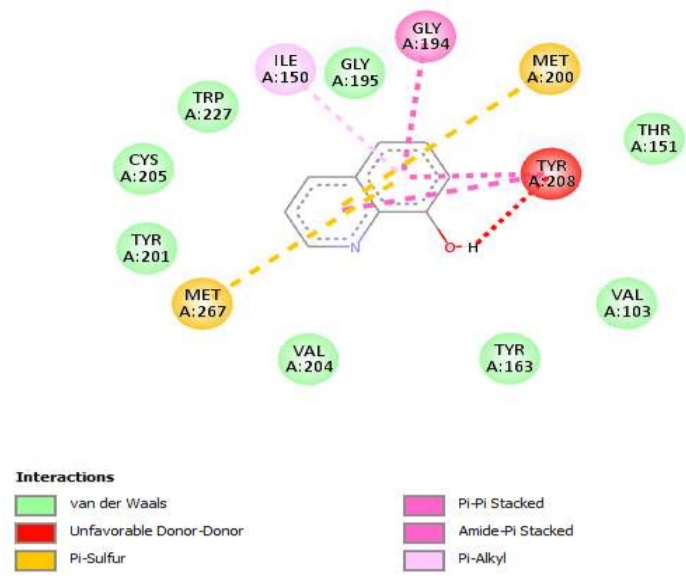
Complexe : 3HNR - ligand Phenylethyl alcool



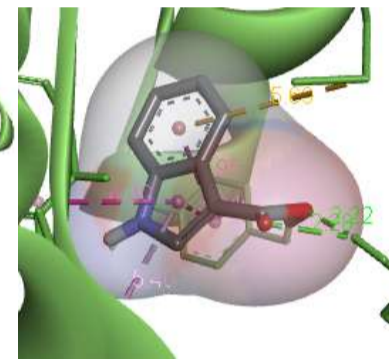
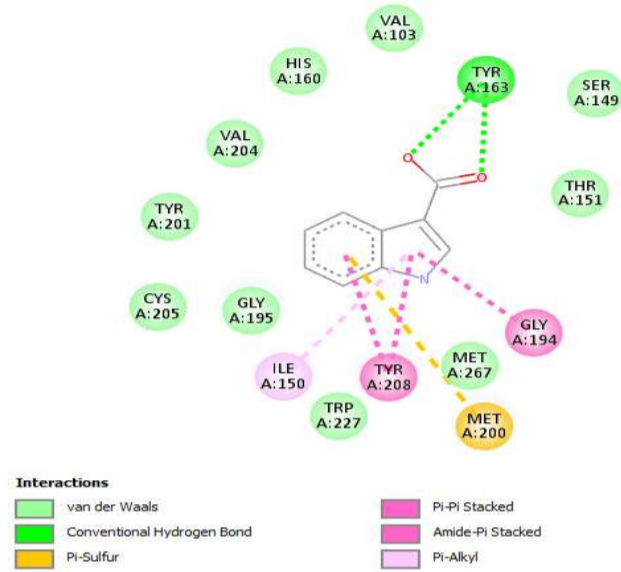
Complexe : 3HNR - ligand P-hydroxybenzaldehyde



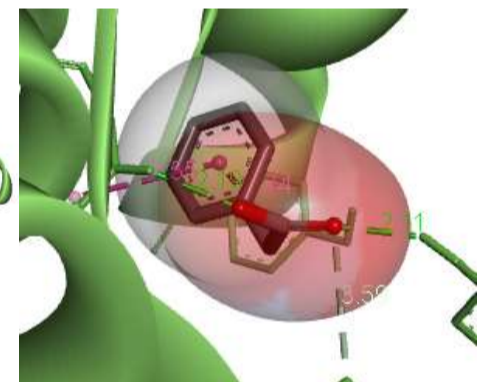
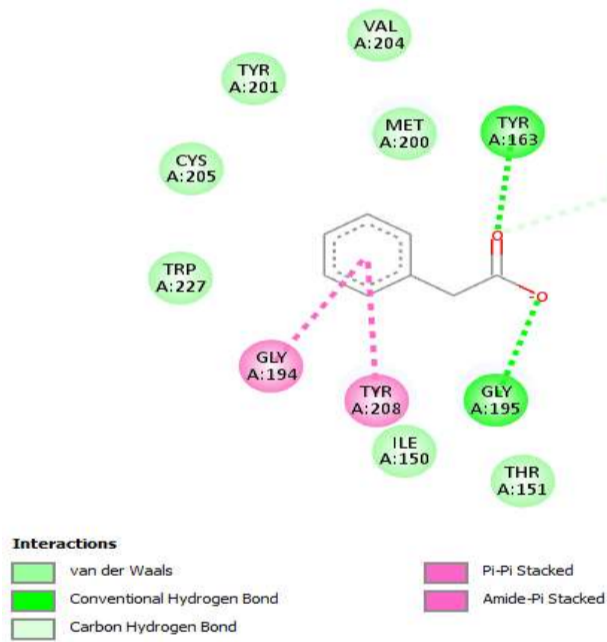
Complexe : 3HNR - ligand Tyrosol



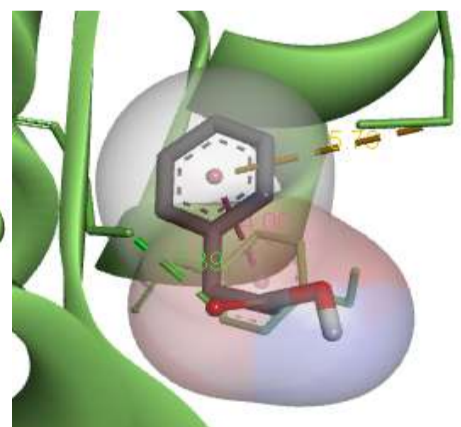
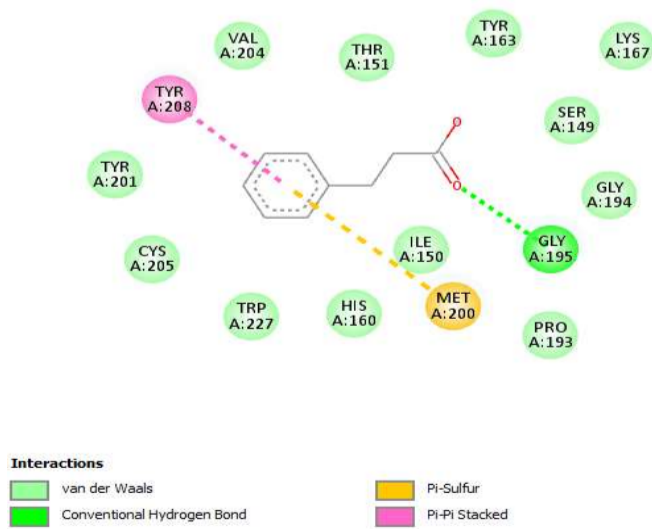
Complexe : 3HNR - ligand 8-Hydroxyquinoline



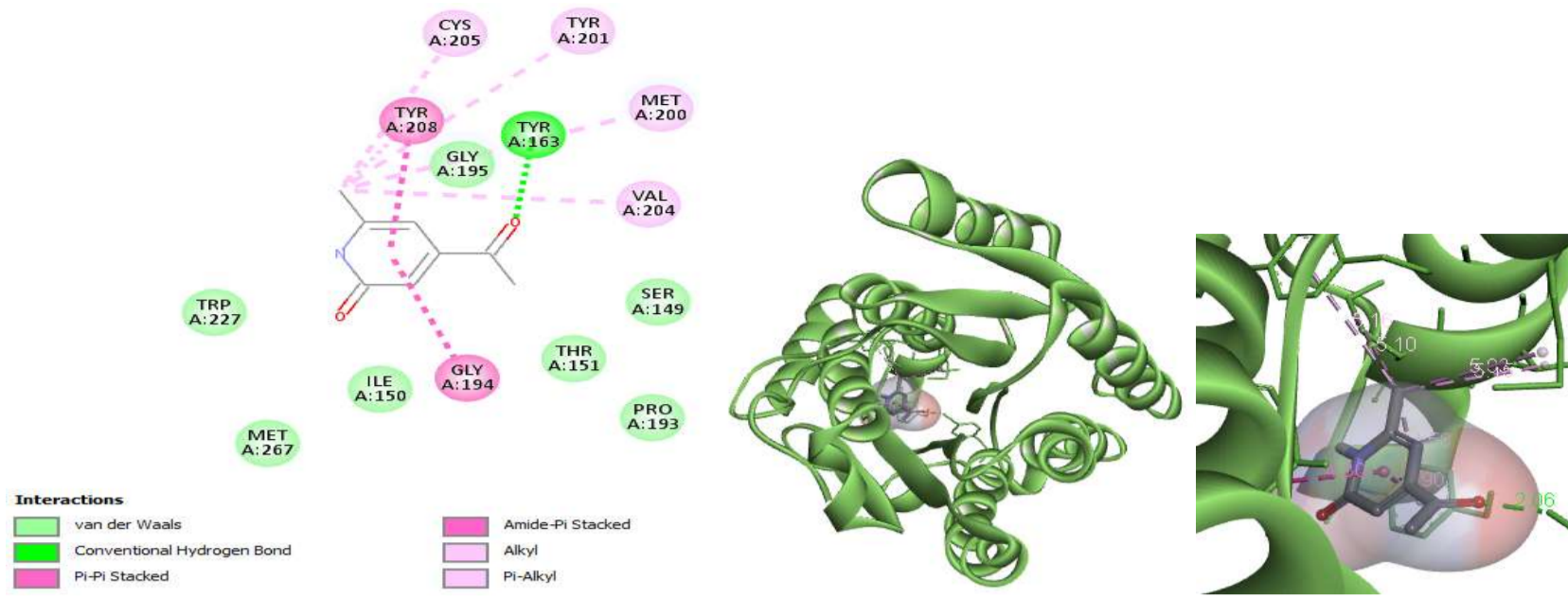
Complexe : 3HNR - ligand acide indole-3-carboxylique



Complexe : 3HNR - ligand Phenylacetate



Complexe : 3HNR - ligand acide 3-Phenylpropionique



Complexe : 3HNR - ligand Streptokordin

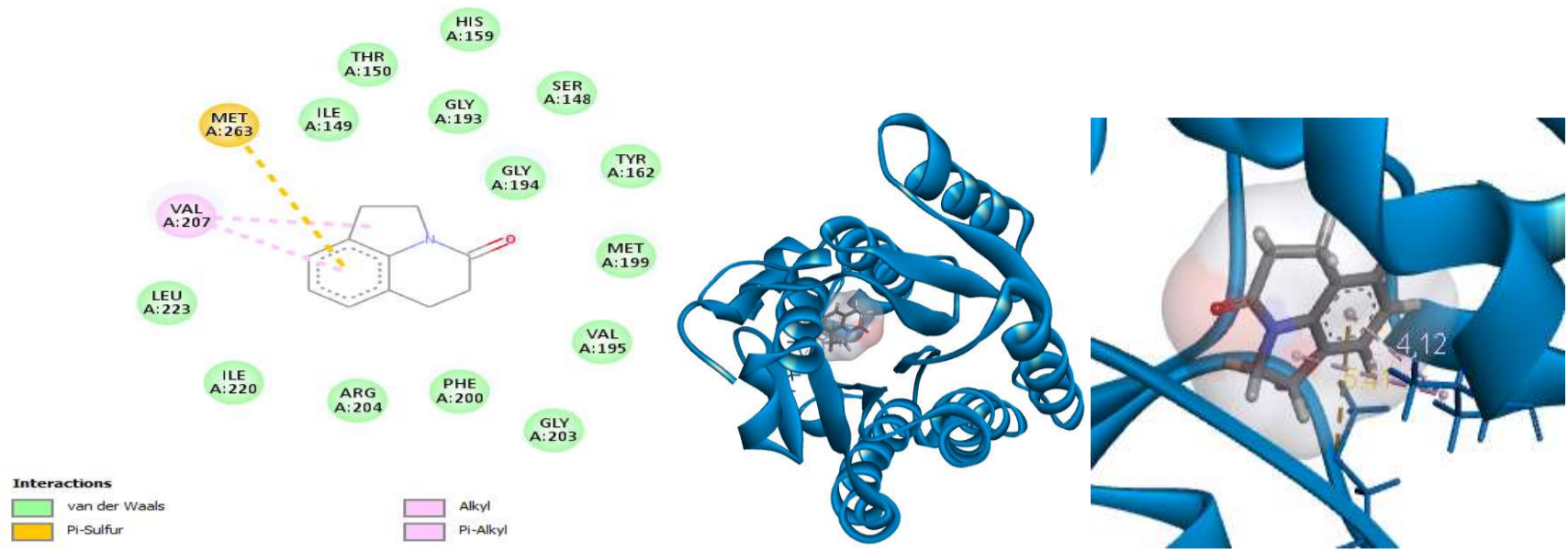
Figure 56. Illustrations 2D et 3D des interactions entre la 3HNR et ses meilleurs ligands

Tableau 37. Types d'interactions entre le récepteur 3HNR et les meilleurs ligands fongiques et actinomycétales.

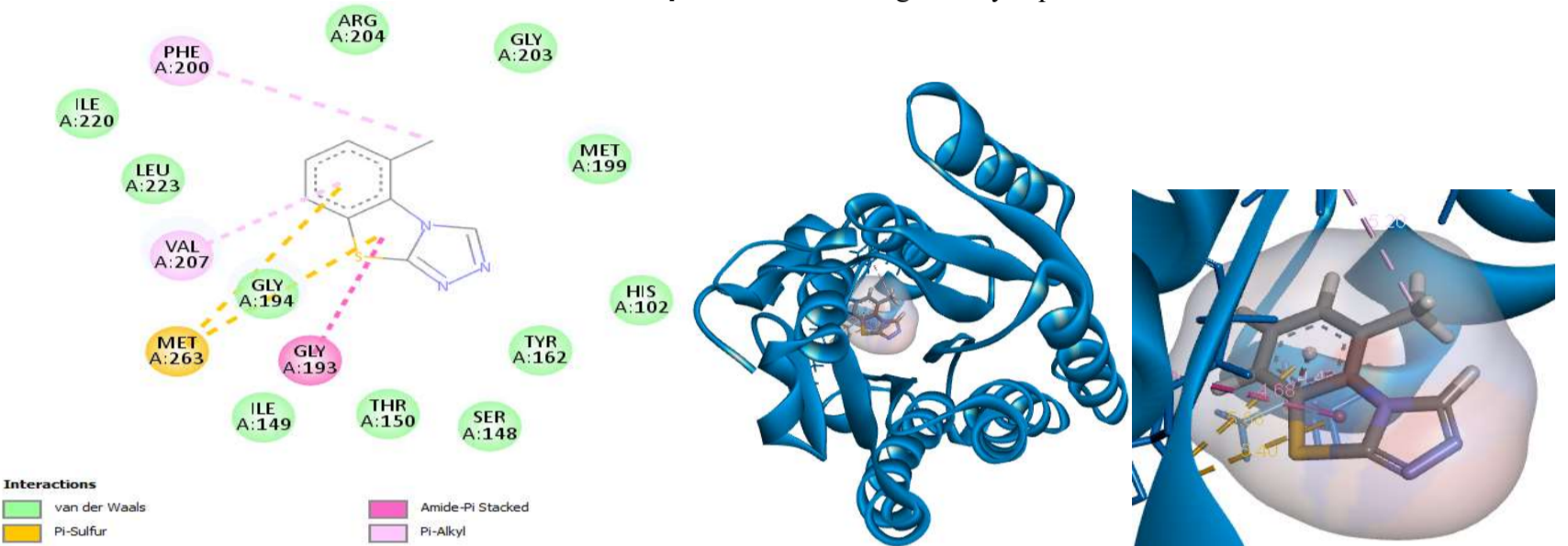
	Ligand	Interaction hydrogène	Interaction hydrophobique	Interaction électrostatique	Interaction Van Der waals
Fongicide	Pyroquillon	Ile150, Ser149	Ile150, Trp227, Tyr208, Tyr208	Met200	Thr151, Tyr163, His160, Val103, Gly194, Met267, Gly195, Val204, Tyr201, Cys205
	Tricyclazole	/	Tyr208, Tyr208, Tyr208, Ile150,	/	Tyr163, Pro193, Ile196, Gly195, Thr198, Ser149, Tyr201, Gly194, Thr151, Val204, Cys205, Trp227
	Phthalide	/	Tyr208	Met200	Thr151, Ile150, Tyr163, Gly194, Gly195, Met267, Val103, Trp227, Val204, Tyr201, Cys205
	4-nitro - inden-1- one	Tyr163, Tyr208, Cys205	Tyr208, Tyr208, Gly194, Ile150	Met200, Met267	Val204, Tyr201, Val103, Gly195, Trp227, His160, Ser149, Thr151
Champignons	Phenylethyl alcool	Tyr163, Ser149	Tyr208	Met200	Cys205, Tyr201, Trp227, Val204, Ile150, Gly195, His160, Thr151, Gly194, Pro193
	P-hydroxybenzaldehyde	Tyr163, Ser149	Tyr208, Gly194	Met200	Pro193, Thr151, Ile150, Met267, Val103, Gly195, Val204, Trp227, Tyr201, Cys205
	Tyrosol	Cys205	Gly194, Tyr208	Met200	Ile196, Lys167, Ser149, Thr151, Pro193, Tyr163, Ile150, His160, Gly195, Met267, Trp227, Val204, Tyr201
Actinomycètes	8-Hydroxyquinoline	/	Tyr208, Ile150 Gly194, Tyr208	Met267, Met200	Gly195, Cys205 Tyr201, Val204 Val103, Trp227 Thr151, Tyr163
	Acide indole-3-carboxylique	Tyr163, Tyr163	Tyr208, Gly194, Ile150 Tyr208	Met200	Ser149, Thr151 His160, Val103 Val204, Tyr201, Cys205 Trp227, Gly195 Met267
	Phenylacetate,	Tyr163, Gly195 Ser149	Tyr208, Gly194	/	Trp227, Cys205 Val204, Tyr201 Ile150, Met200, Thr151 Pro193
	Acide 3-Phenylpropionique	Gly195	Tyr208	Met200	Thr151, Ile150 Gly194, Pro193 Val204, Tyr201 Cys205, Trp227, Lys167, Ser149, Tyr163, His160
	Streptokordin	Tyr163	Gly194, Tyr208, Val204, Met200, Tyr201, Cys205	/	Gly195, Pro193, Trp227, Met267, Ile150, Thr151, Ser149

3HNR a formé avec le fongicide Pyroquillon 17 interactions dont deux liaisons d'H avec les résidus Ile150 et Ser149, 4 interactions hydrophobiques avec Ile150, Trp227, Tyr208, Tyr208, 1 interaction électrostatique avec Met200 et 10 interactions de Van Der Waals. Cependant, avec le fongicide Tricyclazole, l'enzyme forme 16 interactions dont 4 hydrophobiques (Tyr208, Tyr208, Tyr208, Ile150) et 12 interactions de Van Der Waals (Tyr163, Pro193, Ile196, Gly195, Thr198, Ser149, Tyr201, Gly194, Thr151, Val204, Cys205, Trp227). Et avec le troisième fongicide Phthalide, l'enzyme forme 13 interactions dont 1 hydrophobique (Tyr208), 1 électrostatique (Met200) et 11 interactions de Van Der Waals. Le fongicide, 4-nitro - inden-1- one interagit également avec le site actif de l'enzyme en formant 17 interactions dont 3 interactions hydrogènes (Tyr163, Tyr208, Cys205), 4 hydrophobiques (Tyr208, Tyr208, Gly194, Ile150), 2 interactions électrostatiques (Met200, Met267) et 8 interactions de Van Der Waals. Pour les métabolites d'origine fongique, le phenylethyl alcool forme avec l'enzyme 14 interactions dont 2 interactions hydrogènes avec Tyr163, Ser149, 1 interaction hydrophobique avec Tyr208, 1 interaction électrostatique (Met200) et 10 interactions de Van Der Waals avec Cys205, Tyr201, Trp227, Val204, Ile150, Gly195, His160, Thr151, Gly194, Pro193. Le P-hydroxybenzaldehyde forme 15 interactions dont 2 interactions hydrogènes (Tyr163, Ser149), 2 hydrophobiques (Tyr208, Gly194), 1 interaction électrostatique (Met200) et 10 Van Der Waals (Pro193, Thr151, Ile150, Met267, Val103, Gly195, Val204, Trp227, Tyr201, Cys205). Le tyrosol forme 17 interactions dont 1 hydrogène (Cys205) 2 hydrophobiques (Gly194, Tyr208), 1 électrostatique (Met200) et 13 Van Der Waals. Pour les ligands actinomycétales, le 8-Hydroxyquinoline a formé 14 interactions avec l'enzyme dont 4 interactions hydrophobiques avec Tyr208, Ile150, Gly194, Tyr208, 2 interactions électrostatiques avec Met267, Met200 et 8 interactions de Van Der Waals. L'acide indole-3-carboxylique a formé avec 3HNR 17 interactions dont 2 hydrogènes (Tyr163, Tyr163), 4 hydrophobiques (Tyr208, Gly194, Ile150, Tyr208), 1 électrostatique (Met200) et 10 interactions de Van Der Waals. Cependant, le phenylacetate a formé avec 3HNR 13 interactions dont 3 liaisons d'H avec Tyr163, Gly195, Ser149. Les acide aminés Tyr208, Gly194 participent également dans l'interaction en fournissant des interactions hydrophobiques et le Trp227, Cys205, Val204, Tyr201, Ile150, Met200, Thr151, Pro193 forment des interactions de Van Der Waals avec le ligand. L'acide 3-Phenylpropionique a formé 15 interactions dont 1 hydrogène (Gly195), 1 hydrophobique (Tyr208), 1 électrostatique (Met200) et 12 interactions de Van Der Waals. Enfin, le streptokordin a établie 14 interactions dont 1 hydrogène (Tyr163), 6 hydrophobiques (Gly194, Tyr208, Val204, Met200, Tyr201, Cys205) et 7 de Van Der Waals.

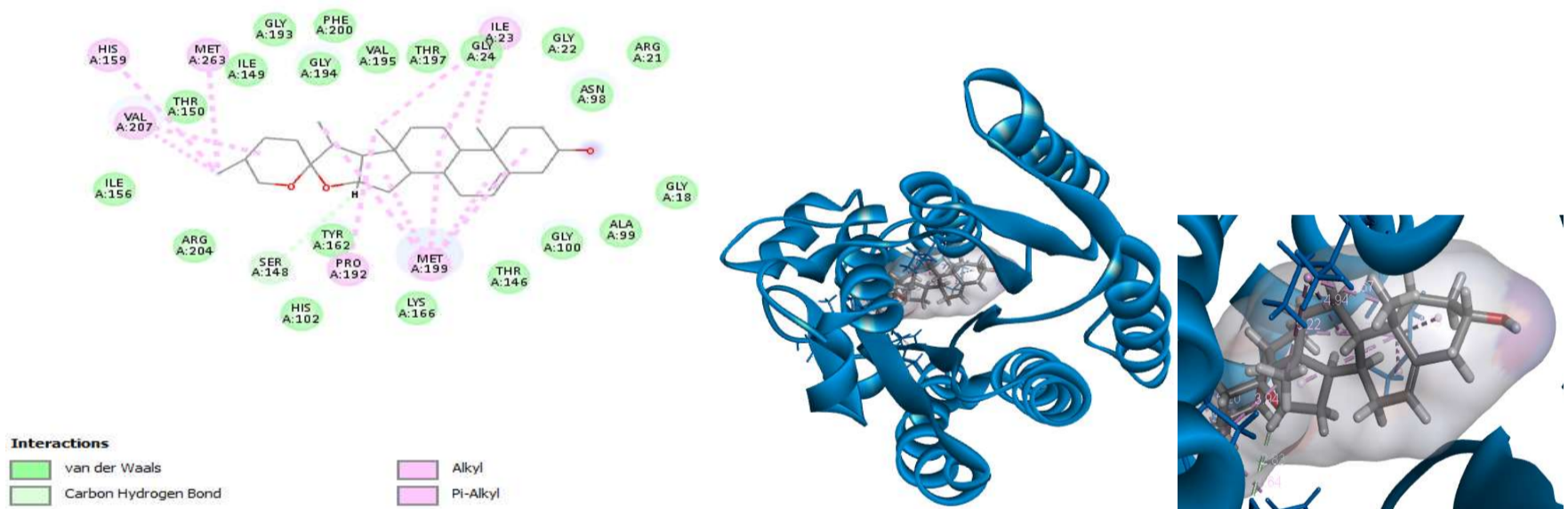
Pour 4HNR, nous avons choisi les ligands fongiques (Camptothecin, Diosgenin, 8-O-dimethylaverufin, acide fusidique, 8-O-methylaverufin) et ligands actinomycétales (Daunorubicin, Doxorubicin, Hygromycin, Nikkomycin, Tetracycline) (**Figure 57, Tableau 38**).



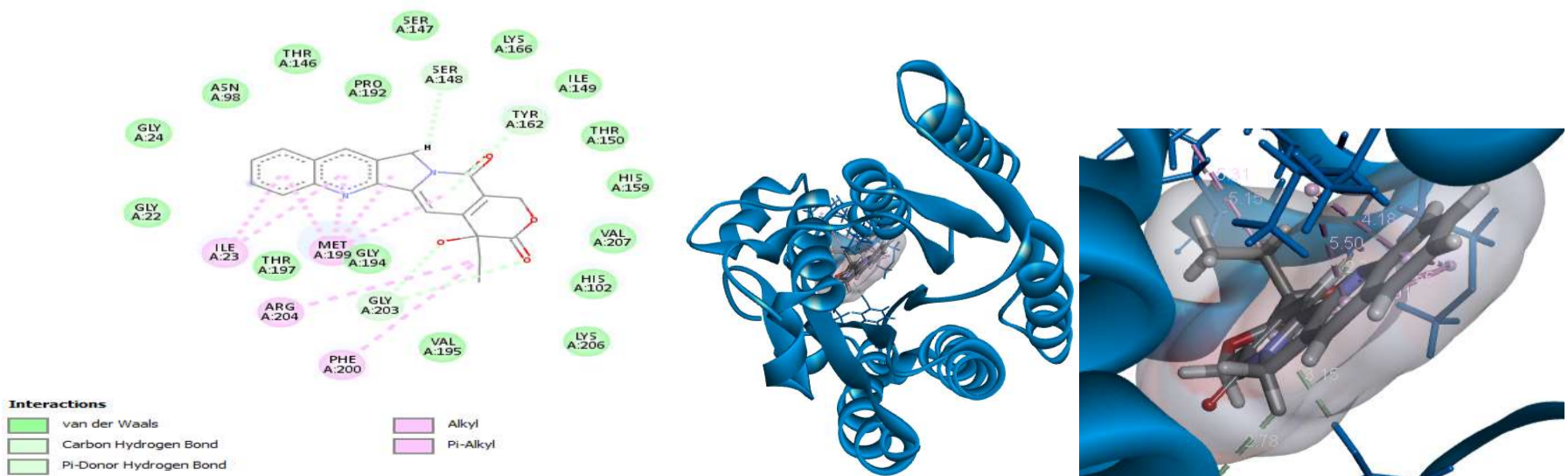
Complexe : 4HNR - fongicide Pyroquillon



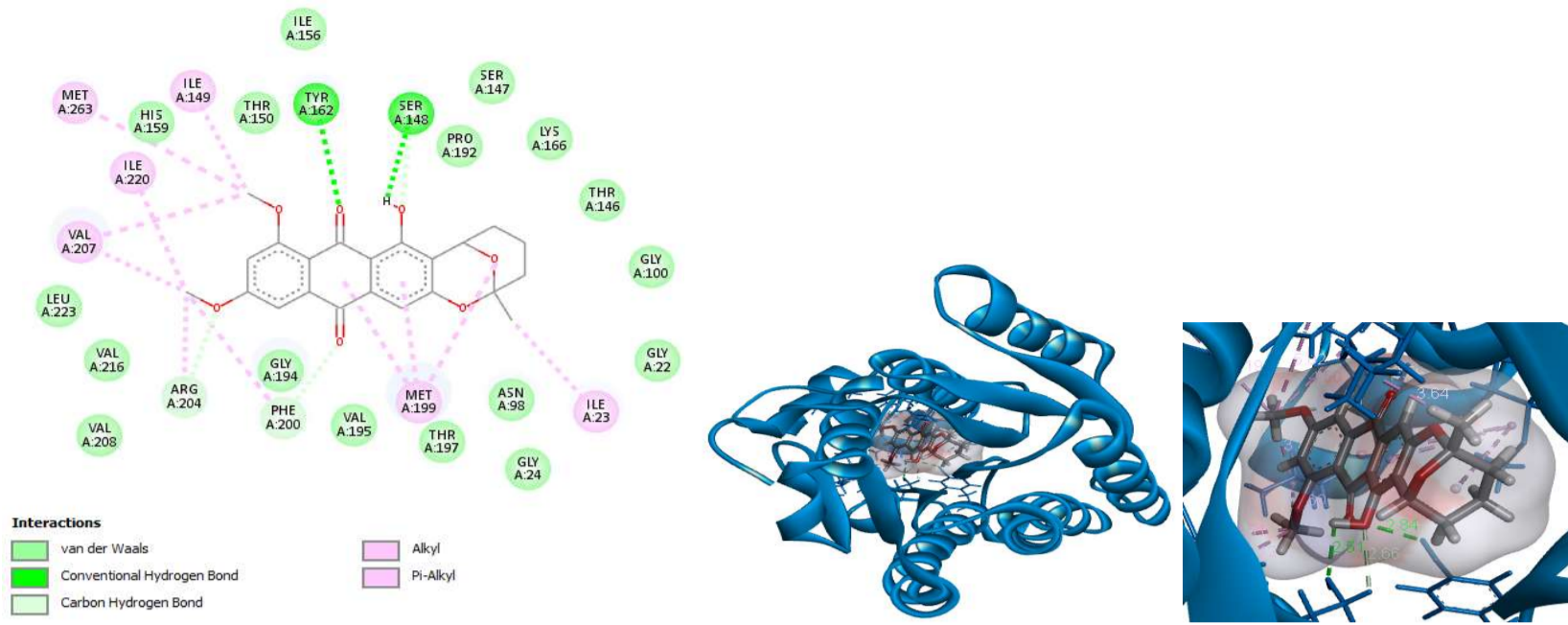
Complexe : 4HNR - fongicide Tricyclazole



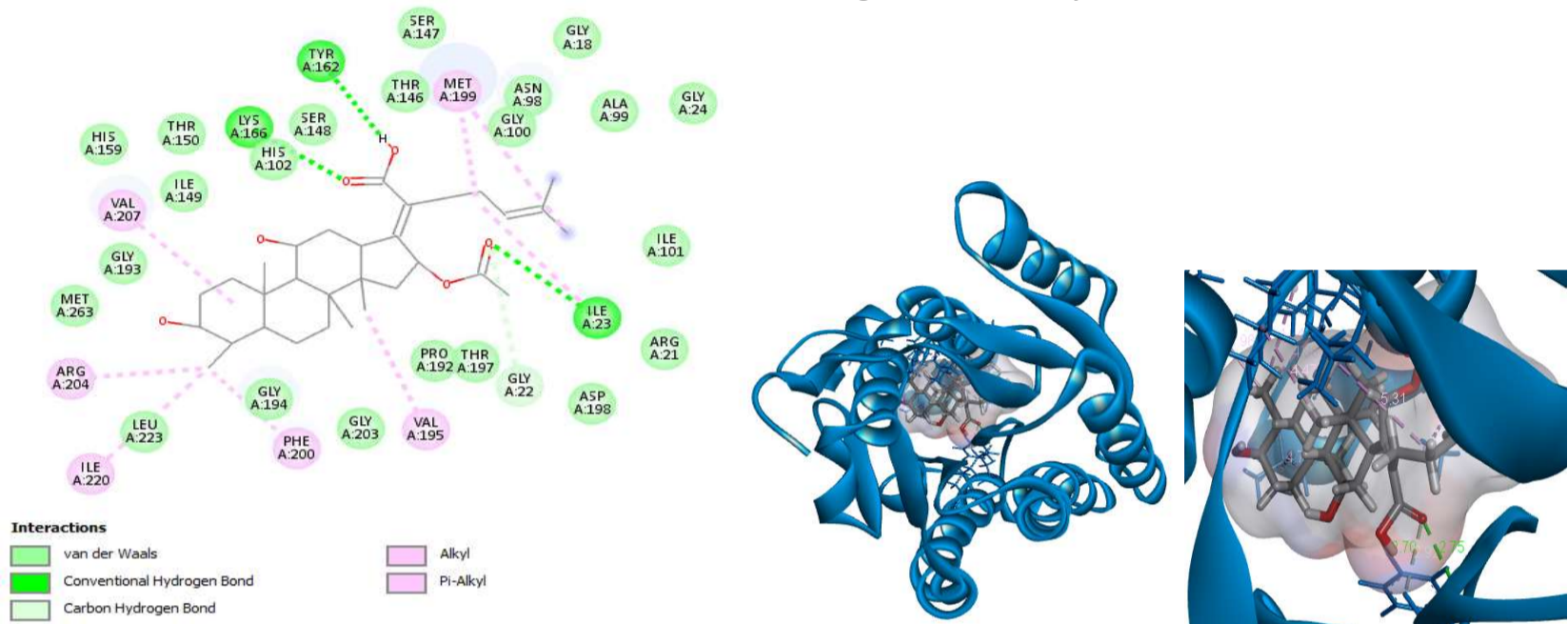
Complexe : 4HNR - ligand Diosgenin



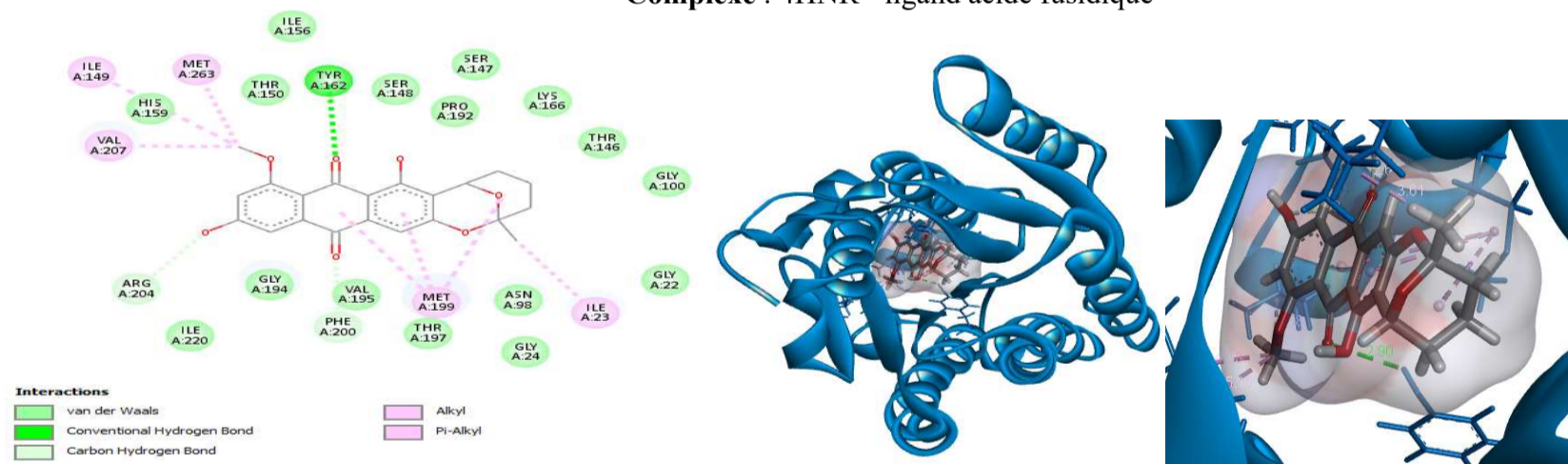
Complexe : 4HNR - ligand Camptothecin



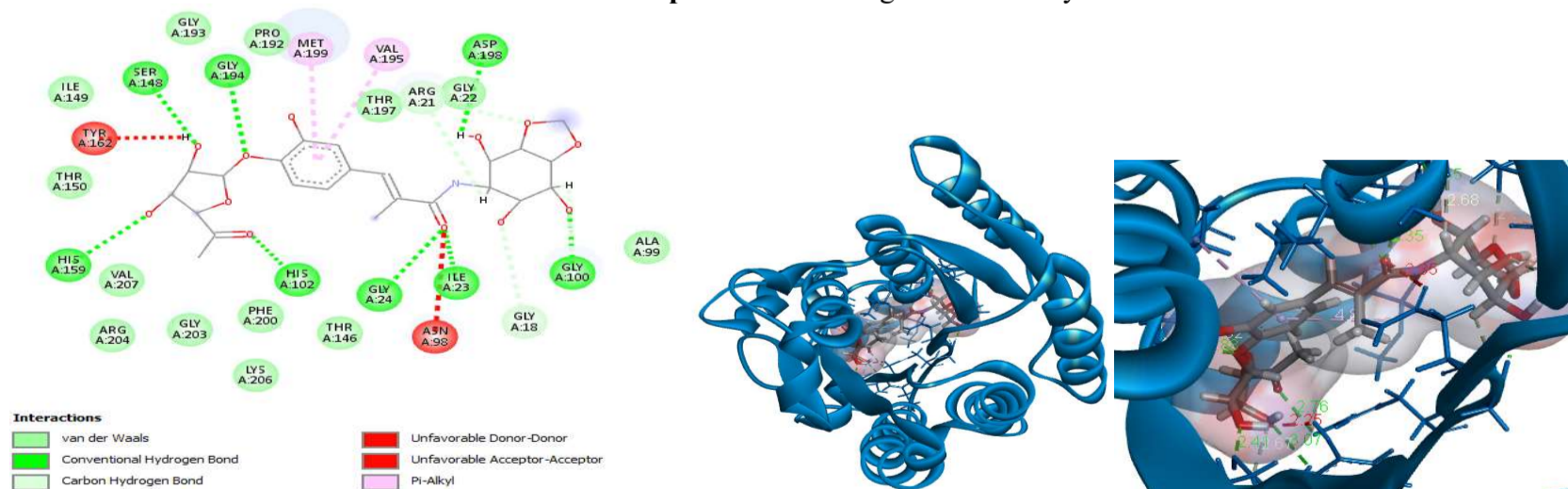
Complexe : 4HNR - ligand 8-O-di methylaverufin



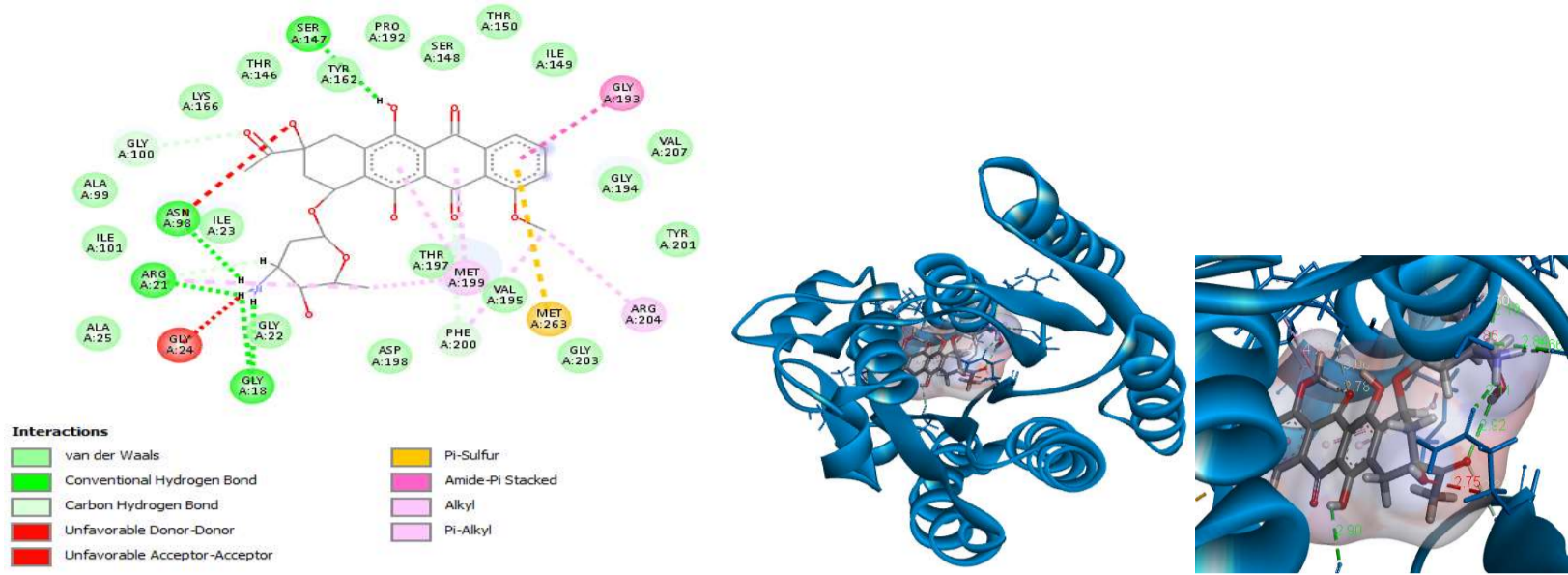
Complexe : 4HNR - ligand acide fusidique



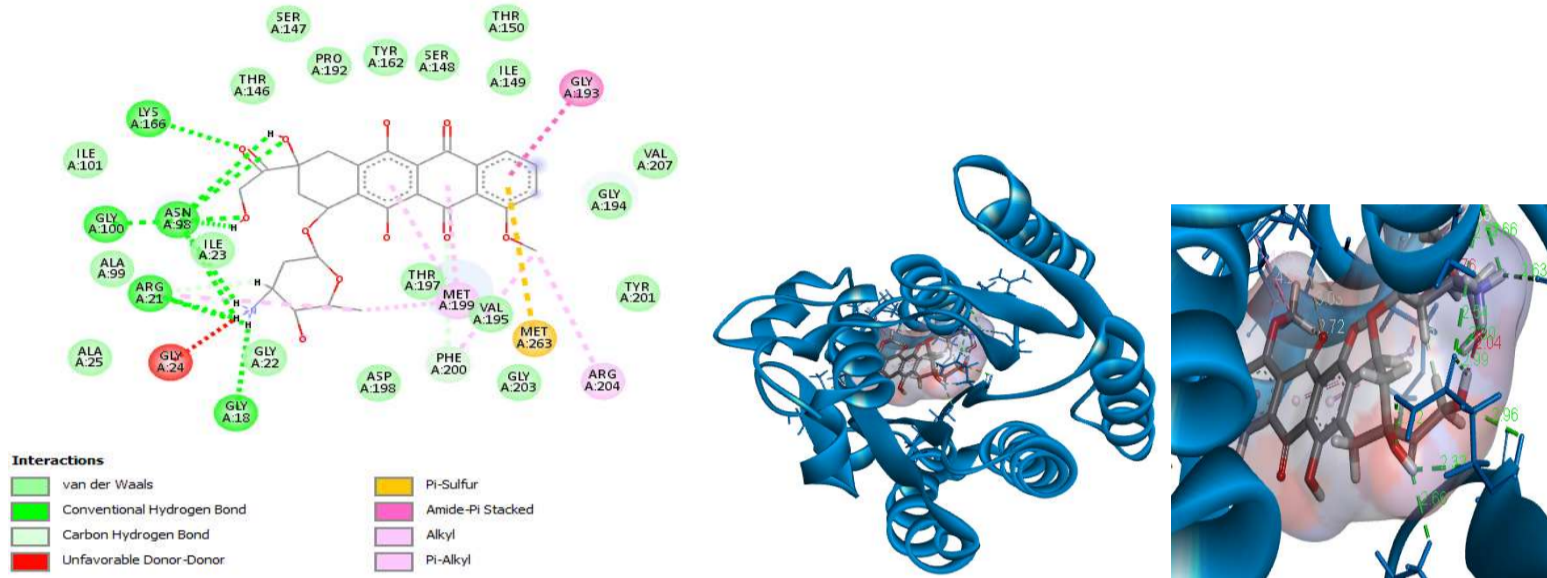
Complexe : 4HNR - ligand 8-O-methylaverufin



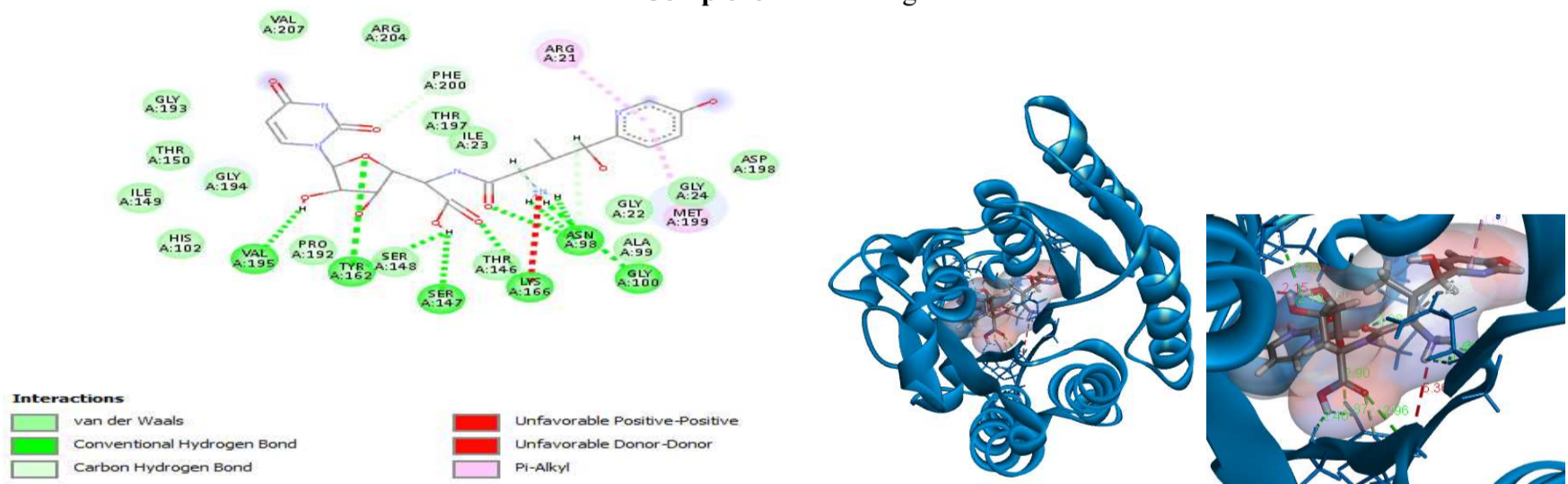
Complexe : 4HNR - ligand Hygromycin



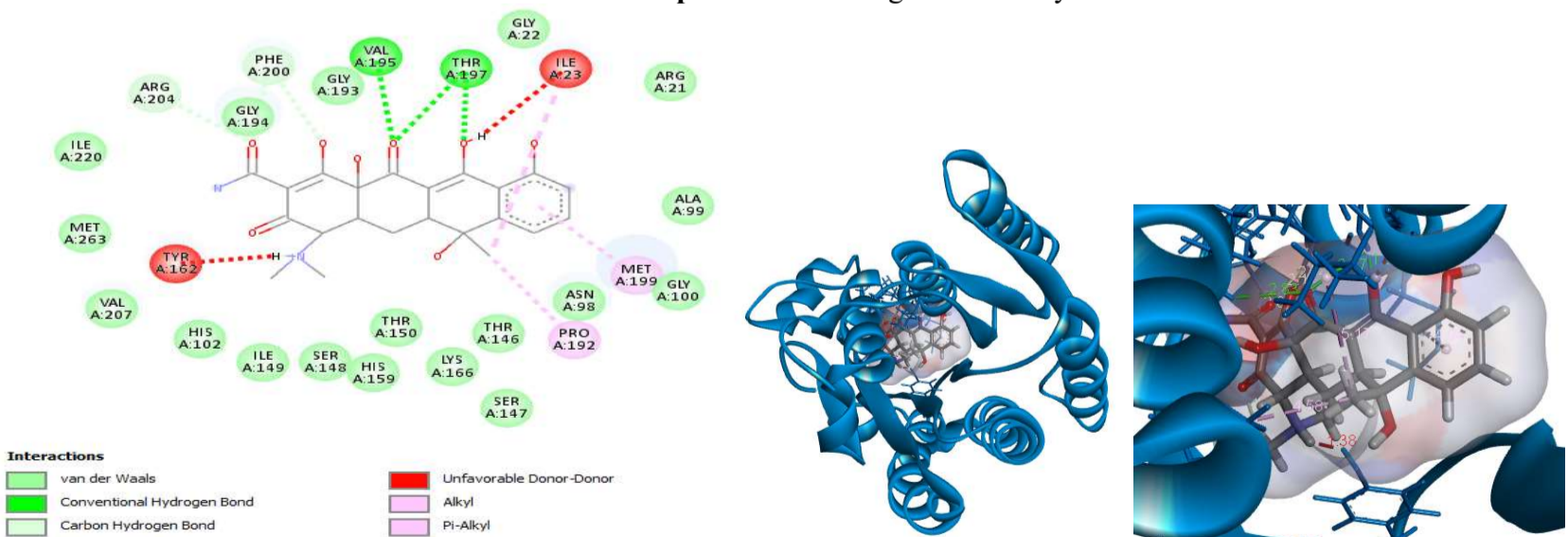
Complexe : 4HNR - ligand Daunorubicin



Complexe : 4HNR - ligand Doxorubicin



Complexe : 4HNR - ligand Nikkomycin



Complexe : 4HNR - ligand Tetracycline

Figure 57. Illustrations 2D et 3D des interactions entre la 4HNR et ses meilleurs ligands

Tableau 38. Types d'interactions entre le récepteur 4HNR et les meilleurs ligands fongiques et actinomycétales.

Ligand		Interaction hydrogène	Interaction hydrophobique	Interaction électrostatique	Interaction Van Der waals
Fongicide	Pyroquillon	/	Val207, Val207	Met263	Met199, Tyr162, Gly194, Ile149, Thr150, Gly193, Leu223, Ile220, Arg204, Phe200, His159, Ser148, Val195, Gly203
	Tricyclazole	/	Val207, Gly193, Phe200	Met263, Met263	His102, Met199, Gly203, Arg204, Leu223, Ile149, Thr150, Ser148, Tyr162, Gly194, Ile220
Champignons	Diosgenin	Ser148	Met199, Met199, Met199, Met199, Ile23, Ile23, Ile23, Pro192, Met263, Val207, Val207, His159	/	Phe200, Val195, Thr197, Gly22, Gly24, Asn98, Gly18, Ala99, Gly100, Thr146, Tyr162, Gly193, Gly194, Ile149, Thr150, Ile156, Arg21, Arg204, His102, Lys166,
	Camptothecin	Gly203, Gly208, Ser148, Tyr162,	Arg204, Phe200, Met199, Met199, Met199, Met199, Ile23, Ile23	/	His102, Lys206, Val207, His159, Thr150, Ile149, Pro192, Thr146, Asn98, Gly24, Gly22, Thr197, Gly194, Val195, Lys166, Ser147,
	8-O-di methylaverufin	Ser148, Tyr162, Ser148, Phe200, Arg204	Ile23, Met199, Met199, Met199, Ile149, Met263, Ile220, Phe200, Arg204, Val207, Val207	/	Thr197, Val195, Gly194, Leu223, His159, Thr150, Pro192, Ser147, Lys166, Gly100, Thr146, Asn98, Gly24, Gly22, Ile156, Val216, Val208
	Acide Fusidique	Ile23, Lys166, Tyr162, Gly22	Val195, Arg204, Phe200, Ile220, Val207, Met199, Met199, Ile23	/	Thr197, Gly194, Leu223, Gly193, Met263, Ile149, Pro192, Thr150, Ser148, Ser147, Thr146, Gly100, Ala99, Asn98, Asp198, Arg21, Ile101, Gly24, Gly18, His102, His159, Gly203,
	8-O-methylaverufin	Tyr162, Arg204, Phe200	Ile23, Met199, Met199, Met199, Val207, Ile149, Met263	/	Thr150, Ser148, Ser147, Pro192, Lys166, Thr146, Gly100, Asn98, Gly24, Thr197, Val195, Gly194, Ile220, His159, Gly22, Ile156,
Actinomycètes	Hygromycin	Gly194, Ser148, His159, His102, Gly100, Arg21, Arg21, Asp198, Gly24, Gly18, Ile23	Met199, Val195	/	Pro192, Gly193, Ile149, Thr150, Phe200, Gly203, Val207, Arg204, Lys206, Thr146, Ala99, Gly22, Thr197
	Daunorubicin	Phe200, Gly100, Asn98, Gly18, Gly18, Arg21, Arg21, Ser147	Arg21, Met199, Met199, Met199, Arg204, Gly193, Phe200	Met263	Asp198, Ala99, Thr146, Lys166, Pro192, Tyr162, Ser148, Thr150, Ile149, Val207, Gly194, Gly203, Val195, Ile23, Thr197, Gly22, Ala25, Tyr201, Ile101,
	Doxorubicin	Asn98, Gly100, Gly100, Lys166, Asn98, Gly18, Arg21, Arg21, Phe200, Asn98	Gly193, Arg204, Met199, Met199, Met199, Arg21, Phe200	Met263	Ile149, Thr150, Ser148, Ser147, Tyr162, Pro192, Thr146, Ala99, Ala25, Gly22, Ile23, Thr197, Asp198, Val195, Gly203, Gly194, Val207, Tyr201, Ile101,
	Tetracycline	Val195, Thr197, Thr197, Phe200, Phe200, Arg204	Ile23, Pro192, Met199	/	Gly194, Met263, Ile220, Val207, Ile149, Thr150, Ser148, His159, His102, Ser147, Lys166, Thr146, Ala99, Gly100, Asn98, Arg21, Gly22, Gly193
	Nikkomycin	Lys166, Ser147, Tyr162, Tyr162, Val195, Asn98, Asn98, Asn98, Gly100, Phe200	Met199, Arg21	/	Ser148, Pro192, Thr146, Ile23, Asp198, Gly22, Gly24, Ala99, Thr197, Val207, Arg204, Gly194, Gly193, Thr150, Ile149, His102

L'enzyme 4HNR a formé avec le fongicide Pyroquillon 17 interactions dont 2 interactions hydrophobiques avec Val207, Val207, une interaction électrostatique avec Met263 et 14 interactions de Van Der Waals avec Met199, Tyr162, Gly194, Ile149, Thr150, Gly193, Leu223, Ile220, Arg204, Phe200, His159, Ser148, Val195, Gly203. Cependant, avec le fongicide Tricyclazole l'enzyme a formé 16 interactions dont 3 hydrophobiques (Val207, Gly193, Phe200), 2 électrostatiques (Met263, Met263) et 11 interactions de Van Der Waals (His102, Met199, Gly203, Arg204, Leu223, Ile149, Thr150, Ser148, Tyr162, Gly194, Ile220). Concernant les ligands fongiques, le diosgenin forme avec l'enzyme 33 interactions dont 1 interaction hydrogène avec Ser148, 12 interactions hydrophobiques avec Met199, Met199, Met199, Met199, Ile23, Ile23, Ile23, Pro192, Met263, Val207, Val207, His159, et 30 interactions de Van Der Waals. De son côté, le Camptothecin forme 28 interactions dont 4 interactions hydrogènes (Gly203, Gly208, Ser148, Tyr162), 8 hydrophobiques (Arg204, Phe200, Met199, Met199, Met199, Met199, Ile23, Ile23), et 16 Van Der Waals. Le 8-O-di methylaverufin forme 33 interactions dont 5 hydrogènes (Ser148, Tyr162, Ser148, Phe200, Arg204) 11 hydrophobiques (Ile23, Met199, Met199, Met199, Ile149, Met263, Ile220, Phe200, Arg204, Val207, Val207), et 17 Van Der Waals. L'acide fusidique, forme 34 interactions dont 4 hydrogènes (Ile23, Lys166, Tyr162, Gly22) 8 hydrophobiques (Val195, Arg204, Phe200, Ile220, Val207, Met199, Met199, Ile23), et 22 Van Der Waals. Cependant, le 8-O-methylaverufin forme 26 interactions dont 3 hydrogènes (Tyr162, Arg204, Phe200) 7 hydrophobiques (Ile23, Met199, Met199, Met199, Val207, Ile149, Met263), et 16 Van Der Waals. Pour les ligands actinomycétales, l'hygromycin a formé 26 interactions avec l'enzyme dont 11 interactions hydrogènes avec Gly194, Ser148, His159, His102, Gly100, Arg21, Arg21, Asp198, Gly24, Gly18, Ile23, 2 interactions hydrophobiques avec Met199, Val195 et 13 interactions de Van Der Waals. La daunorubicin a formé avec 4HNR 35 interactions dont 8 hydrogènes (Phe200, Gly100, Asn98, Gly18, Gly18, Arg21, Arg21, Ser147), 7 hydrophobiques (Arg21, Met199, Met199, Met199, Arg204, Gly193, Phe200), 1 électrostatique (Met263) et 19 interactions de Van Der Waals. Cependant, la doxorubicin a formé avec 4HNR 37 interactions dont 10 liaisons d'H avec Asn98, Gly100, Gly100, Lys166, Asn98, Gly18, Arg21, Arg21, Phe200, Asn98. Les résidus Gly193, Arg204, Met199, Met199, Met199, Arg21, Phe200, ont fourni des interactions hydrophobiques et le Met263 a établie avec le ligand une interaction électrostatique. D'autres attraction de Van Der Waals sont également observées au sein du complexe. La tetracycline a formé 27 interactions dont 6 hydrogènes (Val195, Thr197, Thr197, Phe200, Phe200, Arg204), 3 hydrophobiques (Ile23, Pro192, Met199), et 18 interactions de Van Der Waals. Enfin, la

nikkomycin a formé 28 interactions dont 10 hydrogènes (Lys166, Ser147, Tyr162, Tyr162, Val195, Asn98, Asn98, Asn98, Gly100, Phe200), 2 hydrophobiques (Met199, Arg21) et 16 de Van Der Waals.

Comme conclusion générale sur l'investigation des interactions moléculaires établies au sein des différents complexes récepteur-ligand étudiés, nous pouvons dire que la plupart des top-ligands fongiques ou actinomycétales interagissent avec leur récepteur en établissant au moins une liaison avec l'un des acides aminés clé du site actif des enzymes modélisé. Ces acides aminés ont été déterminés en réalisant des alignements des séquences requêtes avec leur meilleurs templates respectifs, ce qui nous a permis les identifier à partir des appariements issus des alignements. En interrogeant avec ces résidus clés, les ligands en question bloquent soit l'entrée des substrats normaux de ces enzymes (action compétitive) ou la sortie du produit de leur produit d'hydrolyse (action non-compétitive) affectant ainsi la fonction biologique naturelle de ces enzymes.

Par conséquent, on peut conclure que les molécules bioactives produites par les actinomycètes et les champignons filamenteux peuvent avoir des activités antifongiques contre le genre d'*Alternaria* en agissant comme des inhibiteurs potentiels de l'activité biologique de plusieurs cibles enzymatiques potentielles chez ce phytopathogène redoutable.

6. Etude pharmacocinétique et ADMET

Les molécules de type médicamenteux ou phytosanitaires sont définies comme ceux qui ont des propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques appropriées pour devenir des molécules biologiquement efficaces et biodisponibles. Malgré la définition claire, l'étude des propriétés de composé chimique de type médicaments ou phytosanitaires est une tâche difficile. À cette fin, les descripteurs moléculaires sont utiles car ils fournissent une expression numérique des caractéristiques chimiques. Des descripteurs tels que le poids moléculaire, le nombre d'hydrogènes ou le nombre de liaisons rotatives expriment des caractéristiques telles que la taille, la polarité et la flexibilité. La somme de plusieurs descripteurs moléculaires différents est utilisée pour établir le profil des principales caractéristiques pharmacocinétiques d'un médicament ou un produit phytosanitaire (**Loureiro et al., 2019**). Le **tableau 39** résume le résultat des caractéristiques pharmacocinétiques des ligands biofongicides potentiels.

Dans le cas de notre investigation, les molécules étudiées ne sont pas destinées à être des médicaments mais plutôt des molécules phytosanitaires. Par conséquent, le but de cette

partie d'étude n'est pas la prédiction de l'efficacité thérapeutique de nos molécules, mais c'est surtout l'évaluation de leur non-toxicité sanitaire et leur sécurité environnementale, vu qu'elles sont destinées à être appliquées à grande échelle dans l'environnement et sur les produits consommables, et risquent donc de finir dans la chaîne alimentaire humaine et animale. Sur la base de ce point de vue, il sera intéressant de comprendre le comportement de ces molécules et leur impact sur la physiologie des systèmes biologiques des mammifères.

Dans cette investigation, un sous-ensemble de ligands a été sélectionné de l'ensemble global de départ. Dans cette sélection, nous nous sommes basés sur les résultats de l'analyse de l'amarrage moléculaire, de sorte que pour chaque enzyme, les ligands donnant les meilleurs résultats de docking moléculaire ont été choisis et soumis aux différents tests *in silico* de leurs propriétés pharmacocinétiques.

Tableau 39. Résultat de l'étude pharmacocinétique des ligands biofongicides potentiels

	Poids moléculaire (g/mol)	LogP	LogS	HBA	HBD	TPSA (Å ²)	AMR	nRB	Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge
Altersolanol A	336.080	1.1	-3.14 (S)	8	6	147.68	79.36	4	Oui	Non	Non	Non	Oui
Bassianin	395.45	3.83	-3.66 (S)	5	3	99.76	114.57	7	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Camptothecin	348.35	2.20	-5.83 (M.S)	5	1	81.42	95.31	1	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Cerinolactone	290.40	3.26	-2.62 (S)	3	1	46.53	83.80	2	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Diosgenin	414.62	5.01	-4.49(MS)	3	1	35.69	121.59	0	Oui	Non	Oui	Oui	Non
8-O-di methylaverufin	396.39	3.06	-5.86(MS)	7	1	91.29	102.34	2	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Emodin	270.24	1.87	-3.91 (S)	5	3	94.83	70.78	0	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Acide Fusidique	516.71	4.74	-4.30(MS)	6	3	104.06	146.36	6	Oui	Non	Oui	Oui	Non
Fusapyrone	606.79	4.41	-4.41(MS)	9	6	160.82	169.96	16	Non	Non	Non	Non	Non
Acide Gibberellique	290.40	3.26	-2.62(S)	3	1	46.53	83.80	2	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Gibberellins	346.37	1.15	-1.46 (S)	6	3	104.06	86.87	1	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Griseofulvin	352.77	2.41	-4.71(MS)	6	0	71.06	86.59	3	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Huperzine A	242.32	1.91	-3.83 (S)	2	2	58.88	72.87	0	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Acide Kojique	142.11	-0.16	-1.17(S)	4	2	70.67	33.13	1	Oui	Non	Oui	Oui	Non
Lovastatine	404.54	3.89	-3.17(S)	5	1	72.83	113.92	7	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
8-O-methylaverufin	382.36	2.65	-5.17(MS)	7	2	102.29	97.87	1	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
6-O methyl alaternin	300.26	1.92	-4.02 (M.S)	6	3	104.03	77.28	1	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Mevinlon	404.51	3.80	-3.19(S)	4	1	72.72	113.80	6	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
phenylethyl alcool	122.16	1.64	-2.58(S)	1	1	20.23	37.38	2	Oui	Non	Oui	Oui	Non
P-hydroxybenzaldehyde	122.12	1.17	-1.72(S)	2	1	37.30	33.85	1	Oui	Non	Oui	Oui	Non
Acide propanoïque	74.08	0.30	0.09(S)	2	1	37.30	18.31	1	Oui	Non	Oui	Oui	Non
Tenellin	369.41	3.34	-3.59(S)	5	3	99.76	105.43	6	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Tyrosol	138.16	1.10	-2.03(S)	2	2	40.46	39.40	2	Oui	Non	Oui	Oui	Non
Xanthone	196.20	2.84	-5.29(MS)	2	0	30.21	59.55	0	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
Anthraquinones	270.28	2.15	-2.40 (S)	4	2	74.60	72.90	0	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Antimycin	250.25	1.27	-1.20 (S)	5	2	83.83	63.58	1	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Azalomycin	478.65	3.21	-4.91(MS)	6	3	156.49	128.98	6	Oui	Oui	Non	Non	Non
Cycloheximide	281.35	1.30	-2.38 (S)	4	2	83.47	78.47	3	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Cycloserine	102.09	-1.02	0.27(S)	3	2	64.35	25.13	0	Oui	Non	Oui	Oui	Non
Daunorubicin	527.22	1.12	-4.04(MS)	11	5	185.84	131.50	4	Non	Non	Non	Non	Non
Diazepinomicin	462.58	5.42	-6.49(FS)	4	4	98.48	142.09	8	Oui	Non	Oui	Non	Non
Doxorubicin	543.53	0.44	-3.46(S)	12	6	206.07	132.66	5	Non	Non	Non	Non	Non
8-Hydroxyquinoline	145.16	1.76	3.10(S)	2	1	33.12	43.77	0	Oui	Non	Oui	Oui	Non
Hygromycin	511.48	-1.47	0.72(S)	12	7	204.47	118.27	7	Non	Non	Non	Non	Non
Indole-3-carboxylic acid	161.16	1.56	-2.65 (S)	2	2	53.09	45.06	1	Oui	Non	Oui	Oui	Non
Lomofungin	314.25	0.53	-3.77(S)	7	3	129.58	81.75	2	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Nikkomycin	495.44	-3.12	0.16 (S)	12	8	250.32	114.90	9	Non	Non	Non	Non	Non
Pentalenolactone	276.28	1.44	-1.50 (S)	5	1	76.13	68.73	1	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Phenylacetate	135.14	1.16	-2.14(S)	2	0	40.13	36.04	2	Oui	Non	Oui	Oui	Non
3-Phenylpropionic acid	150.16	1.78	-2.56(S)	2	1	37.30	42.79	3	Oui	Non	Oui	Oui	Non
Polyoxin B	507.41	-5.07	3.14 (S)	14	10	309.98	107.07	12	Non	Non	Non	Non	Non
Streptokordin	151.16	0.97	-2.64(S)	2	1	49.93	42.22	1	Oui	Non	Oui	Oui	Non
Streptothricin	502.52	-4.21	0.32 (S)	11	10	268.90	127.92	12	Non	Non	Non	Non	Non
Tetracycline	495.44	-3.12	0.16(S)	12	8	250.32	114.9	9	Non	Non	Non	Non	Non
Transvalencin	363.37	0.72	-3.19 (S)	7	4	137.32	95.65	11	Oui	Oui	Non	Non	Oui

HBD : Donneur de liaison hydrogène, HBA : Accepteur de liaison hydrogène, TSA : Surface polaire topologique, AMR : réfractivité molaire atomique, nRB : nombre de liaisons rotatives, S : soluble, MS : modérément soluble, FS : faiblement soluble, Résultat acceptable.

6.1. Analyse des propriétés ADME (Drug Likeness)

ADMET désigne l'absorption, la distribution, le métabolisme, l'excrétion et la toxicité des médicaments. Parce qu'il n'est pas pratique d'effectuer des procédures expérimentales ADMET complexes et coûteuses pour un grand nombre de composés, la prédiction ADMET *in silico* devient la méthode de choix dans la découverte précoce des molécules bioactives (**Wang *et al.*, 2015**). Les tableaux ci-dessous montrent les résultats Drug Likeness et ADMET des ligands étudiés.

Lipinski a proposé la « règle de 5 », un filtre important et principal. Cette « règle de 5 » comprend quatre règles principales qui sont : un poids molaire $MW < 500$, $\log P < 5$, nombre d'atomes donneurs de liaison hydrogène $HBD < 5$ et un nombre d'accepteurs de liaison hydrogène atomes $HBA < 10$. Il indique qu'une bonne absorption est moins probable pour un composé si deux ou plusieurs de ces règles sont violées. Cependant, cela ne peut qu'aider à une première interprétation d'une molécule. Un composé qui remplit tous les critères est plus susceptible d'être perméable et, par conséquent, également plus susceptible d'être biodisponible par voie orale. Néanmoins, tous les composés qui remplissent les critères ont une bonne biodisponibilité et une bonne absorption (**Winiwarter *et al.*, 2007**).

Le filtre de Ghose comprend : $160 \leq$ poids moléculaire ≤ 480 , $-0.4 \leq \log P \leq 5.6$, $40 \leq$ la réfractivité molaire ≤ 130 et $20 \leq$ nombre d'atomes ≤ 70 (**Ghose *et al.*, 1999**). Le filtre de Veber inclut un nombre de liaisons rotatives ≤ 10 et une TPSA ≤ 140 (**Veber *et al.*, 2002**). Le filtre d'Egan comprend un $\log P \leq 5.88$ et un TPSA ≤ 131 (**Egan *et al.*, 2000**). Le filtre de Muegge comprend un $200 \leq$ poids moléculaire ≤ 600 , $-2 \leq \log P \leq 5$, TPSA ≤ 150 , le nombre de carbone > 4 , le nombre d'hétéroatomes > 1 , le nombre de liaisons rotatives ≤ 15 , les accepteurs de liaisons hydrogène ≤ 10 et les donneurs de liaisons hydrogène ≤ 5 (**Muegge *et al.*, 2001**).

Le poids moléculaire est lié à la taille de la molécule. Les composés à haut poids moléculaire sont moins susceptibles d'être absorbés et donc d'avoir accès à leur cible. L'augmentation de la taille empêche également la diffusion passive à travers les chaînes latérales aliphatiques serrées de la bicouche lipidique des membranes cellulaires. Ainsi, en essayant de maintenir des poids moléculaires aussi bas que possible devrait être le désir de chaque concepteur de molécules bioactives (**Sreelakshmi *et al.*, 2017**). Le poids moléculaire est l'un des paramètres de la « règle des cinq » de Lipinski, les composés avec un poids moléculaire de 180 à 500 Dalton sont perçus comme biologiquement plus efficaces (**Virani, 2018**).

A l'exception des ligands acide fusidique, fusapyrone, daunorubicin, doxorubicin, hygromycin, polyoxin B, streptothricin, les métabolites choisis ont tous des poids moléculaires ne dépassant pas 500 g/mol. Ce qui signifie qu'ils peuvent avoir une diffusion facile à travers les membranes biologiques. La lipophilie appartient également à l'un des cinq facteurs déterminant la biodisponibilité d'une molécule bioactive dans la règle des cinq critères de Lipinski.

La lipophilie est un paramètre précieux des molécules bioactives qui affecte son activité dans le corps humain. La valeur Log P du composé indique la perméabilité d'une molécule pour atteindre le tissu cible dans le corps (Czyrski, 2019). Plus les valeurs de log P sont faibles, plus la lipophilie de la substance chimique est forte (Yadav et Mohite, 2020). Un guide général pour une bonne biodisponibilité orale est d'avoir un logP modéré ($0 < \log P < 5$). En effet, pour un log P trop élevé, la molécule bioactive a une faible solubilité aqueuse. Dans le cas d'un Log P très bas, molécule bioactive a du mal à pénétrer dans les bicouches lipidiques des membranes cellulaires (Zerroug *et al.*, 2019).

A l'exception de Diosgenin et Diazepinomicin, tous les autres métabolites ont montré un coefficient de lipophilie Log P compris inférieurs à 5, suggérant ainsi une bonne absorption (tableau 39).

La solubilité est un facteur important pour obtenir une action pharmacologique optimal. Le principal problème rencontré lors de la synthèse de nouveaux médicaments par exemple est la faible solubilité. Sur la base du classement standard de la solubilité des molécules bioactives, la valeur de solubilité dans l'eau calculée ($\log S = -2,51$) classe la molécule étudiée comme un bon soluble lorsque Log S comprise entre -1 et -4, et entre 1 et 4 ce qui est la propriété pharmacocinétique recherchée pour l'absorption et la distribution (El-Shamy *et al.*, 2022).

A l'exception de la diazepinomicin qui montre une valeur LogS trop faible le qualifiant de faible soluble, les autres métabolites ont donnant des LogS qui les classe soit comme modérément solubles ou comme activement solubles.

Les liaisons hydrogène augmentent la solubilité dans l'eau. Le nombre de liaisons hydrogène réduit la séparation de la phase aqueuse dans la bicouche lipidique de membrane de perméation par diffusion passive (Sreelakshmi *et al.*, 2017). De nombreux donneurs/accepteurs de liaisons hydrogène peuvent avoir un effet délétère sur la perméabilité de la membrane de la molécule bioactive. Ces groupes polaires peuvent diminuer l'affinité envers la région membranaire hydrophobe et également augmenter la pénalité de désolvatation de l'eau lors de la pénétration de la molécule bioactive. En plus d'avoir la

bioactivité souhaitée, une molécule bioactive doit démontrer une pharmacocinétique favorable, un bon équilibre entre la lipophilie et l'hydrophilie est donc crucial (Coimbra *et al.*, 2021). Yang *et al.*, (2021) rapporte que pour que l'équilibre d'hydrophilie soit atteint, le nombre accepteur de liaisons d'hydrogène doit être compris entre 1 et 10 et le nombre de donneur compris entre 1 et 5.

Concernant le nombre des liaisons H donneurs et accepteur, la majeure partie des métabolites analysés ont montré un nombre inférieur à 10 pour le premier et inférieur à 5 pour le deuxième type (Tableau 39).

TPSA est une propriété physico-chimique décrivant la polarité des molécules. La surface polaire (PSA) d'une molécule est définie comme la somme de la surface sur tous les atomes polaires, principalement l'oxygène et l'azote, y compris également leurs hydrogènes attachés. TPSA est étroitement lié au potentiel de liaison hydrogène d'un composé. Les molécules avec des valeurs $TPSA > 140 \text{ \AA}^2$ ou plus montreraient une mauvaise qualité d'absorption, et des valeurs comprises entre $90 < TPSA < 140 \text{ \AA}^2$ sont nécessaires pour permettre la pénétration à travers les membranes cellulaires (Srivastava, 2021).

D'après les résultats obtenus (Tableau 39), les valeurs TSPA des métabolites analysés les classes en deux catégories, à savoir des molécules ayant une très bonne qualité d'absorption, et des molécules à très faible absorption.

La réfractivité molaire atomique (ARM) est un critère important pour mesurer le facteur stérique. Il est généralement désigné comme une simple mesure du volume occupé soit par un atome individuel ou un cluster (groupe) d'atomes (Almi *et al.*, 2014). Il a également été suggéré que la réfraction molaire entre 40 et 130 est la gamme acceptable de composés biologiquement efficaces (Inbathamizh et Padmini, 2013).

A l'exception des 12 métabolites l'acide fusidique, fusapyrone, acide kojique, phényléthyl alcool, p-hydroxybenzaldehyde, acide propanoïque, tyrosol, cycloserine, daunorubicin, diazépinoïcine, doxorubicin, d'acétate, le critère AMR est vérifié pour tous les ligands étudiés.


Le nombre de liaisons rotatives (NRB) exprime la flexibilité d'une molécule. NRB est le nombre de liaisons qui permettent une rotation libre sur elles-mêmes. La flexibilité moléculaire concerne la facilité avec laquelle la molécule traverse la membrane. Le nombre de liaisons rotatives d'une molécule bioactive efficace est inférieur à 10 (Zerroug *et al.*, 2019).

A l'exception de fusapyrone, Polyoxin B, Streptothricin, Transvalencin, toutes les molécules présentent un nombre de liaisons rotationnelles inférieur à 10, vérifiant ainsi un autre critère de la règle de Veber, qui indique leur bonne biodisponibilité.

Tableau 40. Résultat de l'étude ADME des métabolites fongiques et actinomycétales sélectionnés.

	BBB	Caco2	HIA	PPB	Inhibiteur de CYP1A2	Inhibiteur de CYP2C19	Inhibiteur de CYP2C9	Inhibiteur de CYP2D6	Inhibiteur de CYP3A4	Cl
Altersolanol A	Non	Non	Oui	Oui	-	-	-	-	-	3.321 (F)
Bassianin	Non	Oui	Oui	Oui	-	-	+	-	-	5.868(M)
Camptothecin	Oui	Oui	Non	Oui	+	-	+	-	+	6.862(M)
Cerinolactone	Non	Oui	Non	Oui	-	-	+	-	-	9.582(M)
Diosgenin	Oui	Oui	Non	Oui	-	-	-	-	-	23.33(E)
8-O-di methylaverufin	Non	Oui	Non	Oui	-	+	+	-	+	7.72(M)
Emodin	Non	Oui	Non	Oui	+	-	-	-	+	9.245(M)
Acide Fusidique	Oui	Non	Oui	Oui	-	-	-	-	+	6.56(M)
Fusapyrone	Non	Non	Oui	Oui	-	-	-	-	+	4.722(F)
Gibberellins	Oui	Non	Oui	Non	-	-	-	-	-	1.843(F)
Acide Gibbérannique	Oui	Oui	Oui	Non	-	-	-	-	-	1.843(F)
Griseofulvin	Non	Oui	Non	Non	+	-	+	-	+	7.74 (M)
Huperzine A	Non	Oui	Non	Non	-	-	-	-	-	7.743(M)
Acide Kojique	Non	Oui	Non	Non	-	-	-	-	-	9.06(M)
Lovastatine	Oui	Non	Non	Oui	-	-	+	-	+	18.012(E)
8-O-methylaverufin	Non	Non	Non	Oui	-	-	+	+	+	8.537(M)
6-O methyl alaternin	Non	Oui	Non	Oui	+	-	+	-	+	6.64(M)
Mevinlon	Oui	Non	Non	Oui	-	-	+	-	+	18.01 (E)
Phenylethyl alcool	Oui	Oui	Non	Non	+	-	-	-	-	10.084(M)
P-hydroxybenzaldehyde	Non	Oui	Non	Non	-	-	-	-	-	10.13(M)
Acide propanoïque	Oui	Oui	Non	Non	-	-	-	-	-	6.99 (M)
Tenellin	Non	Oui	Non	Oui	-	-	+	-	-	5.48(M)
Tyrosol	Non	Non	Non	Oui	-	-	-	-	-	1.96(F)
Xanthone	Non	Non	Non	Oui	+	-	-	-	-	1.96(F)
Anthraquinones	Non	Non	Oui	Oui	+	-	-	+	-	2.548(F)
Antimycin	Non	Oui	Non	Oui	-	-	-	-	-	1.662(F)
Azalomycin	Oui	Non	Oui	Oui	-	+	-	-	+	7.331(M)
Cycloheximide	Oui	Oui	Non	Oui	-	-	-	-	-	12.641(M)
Cycloserine	Non	Non	Non	Non	-	-	-	-	-	4.76(F)
Daunorubicin	Non	Non	Oui	Oui	-	-	-	-	-	14.962 (M)
Diazepinomicin	Non	Oui	Non	Oui	-	+	-	-	-	3.97(F)
Doxorubicin	Non	Non	Oui	Oui	-	-	-	-	-	13.025(M)
8-Hydroxyquinoline	Non	Oui	Non	Non	+	-	-	-	-	10.78(M)
Hygromycin	Non	Non	Oui	Oui	-	-	-	-	-	1.404(F)
Indole-3-carboxylic acid	Oui	Oui	Non	Non	+	-	-	-	-	3.576(F)
Lomofungin	Non	Oui	Non	Non	-	-	-	-	-	1.865(F)
Nikkomycin	Oui	Non	Oui	Non	-	-	-	-	-	1.807(F)
Pentalenolactone	Oui	Oui	Non	Non	-	-	-	-	-	4.208(F)
Phenylacetate	Non	Oui	Non	Non	-	-	-	-	-	8.405(M)
Acide 3-phenylpropionique	Non	Oui	Non	Non	-	-	-	-	-	6.589(M)
Polyoxin B	Oui	Non	Oui	Non	-	-	-	-	-	1.569(F)
Streptokordin	Oui	Oui	Non	Non	-	-	-	-	-	6.083(M)
Streptothricin	Oui	Oui	Oui	Oui	-	-	-	-	-	1.308(F)
Tetracycline	Non	Oui	Non	Non	-	-	-	-	-	2.238(F)
Transvalencin	Non	Non	Non	Non	-	-	-	-	-	3.127(F)

BBB : barrière hémato-encéphalique, HIA : Absorption Intestinale Humaine, Caco2 : test de perméabilité, PPB : protéines du plasma sanguin, Cl : clairance, F : faible, M : modéré, E : élevé.

 Résultat acceptable.

La barrière hémato-encéphalique (en anglais Blood Brain Barrier BBB) empêche l'entrée dans le cerveau de la plupart des molécules bioactives à partir du sang. La présence de la BBB rend difficile le développement de nouveaux traitements des maladies du cerveau, ou de nouveaux radiopharmaceutiques pour le cerveau. Tous les produits de la biotechnologie sont des médicaments à grosses molécules qui ne traversent pas la BBB. Bien qu'il soit supposé que les petites molécules soient librement transportées à travers la BBB, environ 98 % sont des grandes molécules qui ne sont pas transportées à travers la BBB (**Pardridge, 2012**). Les résultats sont classifiés en BBB+ (composés qui peuvent traverser la BBB) ou BBB- (composés qui ne peuvent pas traverser la BBB) sont utilisés comme propriété étiquette de la classification des molécules bioactives (**Wang *et al.*, 2018**).

28 métabolites parmi les 45 étudiés sont prédits incapables de traverser la barrière hémato-encéphalique, ces molécules ne manifestent donc aucun risque d'effets secondaires sur le système nerveux central (**Tableau 40**).

La perméabilité au Caco-2 (l'adénocarcinome du côlon humain), est utilisé pour prédire le niveau d'absorption des composés. Caco-2 est un substitut populaire pour l'épithélium intestinal humain pour estimer la perméabilité aux médicaments *in vivo* en raison de leurs propriétés morphologiques et fonctionnelles similitudes avec les entérocytes humains (**Wang *et al.*, 2016**). Un composé avec une perméabilité Caco-2 élevée est facile à absorber (**Han *et al.*, 2019**). Un composé est considéré comme ayant une bonne perméabilité au Caco-2 s'il a une valeur prédite $> -5,15 \log \text{ cm/s}$ (**Xiong *et al.*, 2021**).

La prédiction de l'absorption intestinale humaine (HIA) des molécules bioactives est très importante pour identifier le comportement de ces molécules à l'intérieur du corps humain. Les données HIA sont la somme de la biodisponibilité et de l'absorption évaluées à partir du rapport d'excrétion cumulée dans l'urine, la bile et les fèces (**Kovačević *et al.*, 2014**). Les composés ayant un HIA $> 30 \%$ sont classés comme ayant une absorption intestinale "élevée" et considérée comme un résultat positif et les composés avec des valeurs $\leq 30 \%$ d'HIA sont classés comme ayant une faible absorption intestinale et un résultat négatif (**Piechota, 2015**).

L'absorption intestinale des molécules étudiées représentait par les paramètres Caco2 et HIA varie entre faible et élevée, suggérant que certains ne peuvent pas atteindre activement la circulation systémique, alors que d'autres sont plus disponibles (**Tableau 40**).

L'efficacité d'une molécule bioactive peut être affectée par le degré auquel elle se lie aux protéines du plasma sanguin (PPB). Il convient de noter que la liaison des molécules bioactives aux protéines plasmatiques (telles que l'albumine sérique humaine, les lipoprotéines, les glycoprotéines, les globulines α , β et γ) réduit considérablement la quantité

de ces molécules dans la circulation sanguine générale et, par conséquent, moins une molécule bioactive est liée, plus efficacement, elle peut traverser les membranes cellulaires ou diffuser (Ntie-Kang, 2013). Une molécule bioactive avec une valeur PPB < 85 % présente généralement une bonne distribution dans les tissus et considéré comme un résultat positif (Zhang *et al.*, 2022).

Le cytochrome P450s est un système enzymatique important pour le métabolisme des molécules bioactives dans le foie avec cinq isoformes principales : CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 et CYP3A4. Les deux sous-types principaux du cytochrome P450 sont le CYP2D6 et le CYP3A4. L'inhibition de toute isoforme du CYP entraîne un dysfonctionnement du métabolisme des médicaments et une élévation de la toxicité (Malik *et al.*, 2017).

D'après les résultats obtenus, 22 molécules parmi 45 (Altersolanol A, Gibberellins, Acide Gibbérellique, Huperzine A, Acide Kojique, P-hydroxybenzaldehyde, Acide propanoïque, Tyrosol, Cycloheximide, Cycloserine, Daunorubicin, Doxorubicin, Lomofungin, Nikkomycin, Pentalenolactone, Phenylacetate, Acide 3-phenylpropionique, Polyoxin B, Streptokordin, Streptothricin, Tetracycline, et Transvalencin) n'inhibent pas les cinq isoformes du CYP et donc sont sans danger sur le métabolisme alors que le reste des molécules inhibent un ou deux ou trois différentes classes de cytochromes (Tableau 40).

La clairance totale est un paramètre d'excrétion important. Sa prédiction nous aide à déterminer la faisabilité du dosage clinique et fournit un cadre pour la dose de départ pour les premières études sur l'homme (Durán-Iturbide *et al.*, 2020). Dans ce travail, la clairance du médicament était représentée par la constante Cl et se produit principalement comme une combinaison de clairance hépatique (métabolisme dans le foie et clairance biliaire) et de clairance rénale (excrétion par les reins). Cl est classifié en 3 catégories : < 5ml/min/kg faible ; [5-15 ml/min/kg] modéré ; >15 ml/min/kg élevé.

Les métabolites analysés montrent des valeurs Cl qui les classent dans les 3 catégories d'excrétion avec une prédominance du caractère de l'excrétion modérée, favorisant ainsi leur éjection hors de la circulation sanguine (Tableau 40).

6.2. Analyse des propriétés toxicologiques des ligands

Le test AMES est utilisé pour évaluer le potentiel de la mutagénicité d'un composé. La détection du potentiel de mutagénicité d'un composé pourrait contribuer à stopper le

développement de drogues nocives. Les composés qui ont été supposés être mutagènes, ils peuvent agir comme cancérigènes (**Bucaio et Solidum, 2022**).

Pour la plupart des molécules analysées, le résultat du test AMES était négatif, suggérant leurs non mutagénicité (**Tableau 41**).

La cancérogénicité est l'un des paramètres toxicologiques la plus préoccupante pour la santé humaine. Selon les autorités réglementaires d'Europe et des États-Unis, des études de cancérogénicité doivent être réalisées avant la demande d'autorisation de mise sur le marché de produits pharmaceutiques et chimiques. C'est impossible d'étudier la cancérogénicité chimique chez l'homme directement sur le corps, de sorte que les animaux sont généralement utilisés pour l'évaluation de la cancérogénicité. La méthode la plus générale de cancérogénicité « l'évaluation » est un test de cancérogénicité de 2 ans pour les animaux (principalement des rats et des souris). Cette approche expérimentale prend du temps et est très coûteuse, et a apporté beaucoup de critiques de la part des militants des droits des animaux, ce qui se traduit par un besoin urgent de modèles informatiques pour prédire la cancérogénicité sur la base des structures chimiques et leurs propriétés physiques (**Li et al., 2015**).

Les résultats de ce test montrent que certains métabolites peuvent avoir un effet cancérigène (**Tableau 41**).

Le gène humain lié à l'éther-a-go-go (HERG) code pour un canal ion potassium (K^+) qui est impliqué dans l'arythmie fatale (**Hedley et al., 2009**). Le canal HERG K^+ , qui est surtout connu pour sa contribution à l'activité électrique du cœur qui coordonne les battements du cœur, semble être la cible moléculaire responsable de la toxicité cardiaque d'un large éventail de composés chimiques (**Ntie-Kang, 2013**). La capacité d'une molécule bioactive à inhiber l'éther a-go-go humain (hERG) est très dangereuse, car elle peut entraîner le blocage du canal ionique potassium du myocarde, ce qui perturbe l'activité électrique du cœur et peut entraîner la mort prématurée (**Abdul-Hammed et al., 2021**).


Les 45 métabolites testés répondent négativement au test d'inhibition du canal cardiaque, suggérant qu'ils ne présentent aucun risque de cardiotoxicité (**Tableau 41**).

L'hépatotoxicité humaine (H-HT) désigne tout type de lésion du foie pouvant entraîner une atteinte des organes, et même la mort. L'hépatotoxicité humaine, parfois, est aussi responsable du sevrage de médicaments approuvés sur le marché (**Sarkar et al., 2020**). L'hépatotoxicité peut impliquer un certain nombre de lésions hépatiques différentes, dont certaines entraînent une défaillance d'organe et, finalement, la mort du patient (**Cheng et Dixon, 2003**).

Pour ce test 30 molécules ont été prédites sans risque d'hépatotoxicité, alors que les 15 restant semblent présenter un possible effet d'atteinte hépatique (**Tableau 41**).

Tableau 41. Suite de résultat de l'étude de l'étude ADMET des composés sélectionnés.

	Test d' Ames	Carcinogénéité	Inhibition de hERG	H-HT	Sensibilisation cutanée	Corrosion oculaire	Toxicité respiratoire	Facteurs de bioconcentration	LC50DM	NR-AR	NR-ER	SR-p53
Altersolanol A	+	-	-	-	-	-	-	0.684	5.451	-	-	+
Bassianin	+	+	-	+	+	-	-	1.224	6.761	-	+	+
Camptothecin	+	+	-	+	-	-	-	1.379	5.553	-	-	+
Cerinolactone	+	+	-	+	+	-	+	1.055	3.144	-	-	+
Diosgenin	-	-	-	-	-	-	+	3.319	5.748	-	-	-
8-O-di methylaverufin	+	+	-	+	+	-	+	0.997	5.964	-	+	+
Emodin	+	-	-	-	+	-	-	1.566	6.716	-	+	+
Acide Fusidique	-	-	-	-	-	-	+	0.309	5.416	-	-	-
Fusapyrone	-	+	-	+	+	-	+	0.793	5.072	-	-	+
Acide Gibbérellique	-	-	-	-	-	-	+	0.039	3.895	-	-	+
Gibbérelline	-	-	-	-	-	-	+	0.039	3.895	-	-	+
Griseofulvin	-	+	-	+	-	-	-	1.204	4.758	-	-	+
Huperzine A	-	+	-	-	-	-	+	0.219	3.975	-	-	-
Acide Kojique	-	+	-	-	+	-	-	0.465	3.607	-	-	-
Lovastatine	-	+	-	+	+	-	+	1.358	6.445	-	-	-
8-O-methylaverufin	+	+	-	+	+	-	+	0.844	5.736	-	+	+
6-O methyl alaternin	+	+	-	-	+	-	-	1.04	6.217	-	+	+
Mevinlon	-	+	-	+	+	-	+	1.348	6.44	-	-	-
Phenylethyl alcool	-	-	-	-	+	+	-	0.773	3.274	-	-	-
P-hydroxybenzaldehyde	-	-	-	-	-	+	+	0.546	4.725	-	+	-
Acide propanoïque	-	-	-	-	-	+	-	0.329	3.242	-	-	-
Tenellin	-	+	-	-	+	-	-	0.707	5.152	-	+	+
Tyrosol	+	+	-	-	+	+	-	0.648	3.897	-	-	-
Xanthone	+	+	-	-	+	-	+	2.643	5.198	-	+	-
Anthraquinones	+	+	-	-	+	-	+	0.879	5.87	-	+	+
Antimycin	-	+	-	+	-	-	+	0.021	4.538	-	-	+
Azalomycin	-	+	-	+	-	-	+	0.708	6.219	-	-	+
Cycloheximide	-	-	-	+	-	-	-	0.372	4.527	-	-	-
Cycloserine	+	+	-	-	-	-	-	0.399	3.588	-	-	-
Daunorubicin	+	+	-	+	-	-	+	0.726	5.958	-	-	+
Diazepinomicin	-	+	-	+	+	-	+	0.998	5.894	-	+	+
Doxorubicin	+	+	-	-	-	-	+	0.567	5.55	-	-	+
8-Hydroxyquinoline	-	-	-	-	+	-	+	0.763	4.425	-	-	+
Hygromycin	-	-	-	+	-	-	-	0.52	4.808	-	-	-
Indole-3-carboxylic acid	-	-	-	-	-	-	+	0.225	4.00	-	-	-
Lomofungin	-	-	-	-	+	-	+	0.154	5.171	-	+	+
Nikkomycin	-	-	-	-	-	-	-	-0.023	4.092	-	-	-
Pentalenolactone	-	+	-	-	-	-	+	0.263	4.395	-	-	+
Phenylacetate	-	-	-	-	-	+	-	0.33	3.244	-	-	-
Acide 3-Phenylpropionique	-	-	-	-	-	+	-	0.363	3.43	-	-	-
Polyoxin B	-	-	-	-	-	-	-	-0.219	2.838	-	-	-
Streptokordin	-	-	-	-	-	-	+	0.377	3.577	-	-	-
Streptothricin	-	-	-	-	-	-	+	-0.295	5.892	-	-	-
Tetracycline	-	-	-	-	-	-	+	-0.043	3.92	-	-	-
Transvalencin	-	-	-	-	-	-	+	0.189	3.881	-	+	-

 Résultat acceptable.

La sensibilisation cutanée est un paramètre clé pour l'évaluation de la sécurité, en particulier pour les produits chimiques dans les produits cosmétiques et de soins personnels (Settivari *et al.*, 2017).

La plupart des molécules testées répondent négativement au test de la sensibilité cutanés (Tableau 41).

La corrosion oculaire est définie comme un endommagement du tissu oculaire ou une détérioration physique grave de la vision, suite au contact d'un produit chimique avec la surface frontale de l'œil. La corrosion oculaire est également appelée lésions oculaires graves (Verma et Matthews, 2015).

Seules six molécules semblent avoir un potentiel de corrosion oculaire, des précautions sont alors nécessaires en cas leur utilisation comme éventuels produits antifongiques (Tableau 41).

La toxicité respiratoire induite par les molécules chimiques est généralement sous-diagnostiquée car il ne peut pas avoir de signes ou de symptômes précoces distincts dans les molécules bioactives courantes et peut survenir avec une maladie et une mortalité importante. Par conséquent, la surveillance et le traitement de la toxicité respiratoire sont d'une grande importance (Lei *et al.*, 2017).

Les résultats montrent qu'également pour ce test, cératines molécules peuvent présenter un risque de toxicité respiratoire ce qui peut nécessiter certaines mesures de protection en cas de leur utilisation comme produits fongicides (Tableau 41).

La bioconcentration dans un organisme implique l'accumulation d'un composé chimique via l'eau, par la respiration ou par le contact avec la peau (Sire et Amouroux, 2016). Le facteur de bioconcentration (FBC) est défini comme le rapport entre la concentration du produit chimique dans l'organisme et la concentration de ce produit dans le milieu environnant (l'eau). La bioconcentration de substances organiques est un élément important de l'évaluation des risques chimiques à des fins scientifiques et réglementaires. Il est utilisé pour considérer l'évaluation des risques pour la santé humaine via la chaîne alimentaire (Xiong *et al.*, 2021). Des concentrations aussi importantes peuvent avoir des effets néfastes sur les organismes, en particulier si les concentrations internes atteignent des niveaux toxiques. Plutôt que de mesurer les concentrations généralement faibles dans l'eau ou l'air, il peut être préférable de mesurer les concentrations relativement plus élevées dans le biote résultant de la bioaccumulation, mais cela nécessite des informations sur l'ampleur et les déterminants de ces concentrations relatives (Mackay *et al.*, 2018).

A l'exception des deux métabolites diosgenin et xanthone, les valeurs FBC prédites pour les molécules étudiées sont inférieures au seuil du risque (<2), ce qui suggère que ces molécules sont probablement sans danger d'être accumulées dans les systèmes biologiques (**Tableau 41**).

La dose létale médiane ou (DL_{50}) est utilisée pour mesurer la toxicité aiguë, qui évalue la toxicité relative d'un composé. LD_{50} représente la concentration de la substance chimique en mg/L qui provoque 50 % de meurt après 48 heures. Plus la LD_{50} est basse, plus le composé est mortel (**Bucaio et Solidum, 2022**). Les composés qui ont la plus faible valeur signifie qu'ils sont les plus mortels. D'autre part, les composés qui ont les taux les plus élevés signifie qu'ils sont les moins létaux.

Allen *et al.*, (2016) montrent que les substances avec des valeurs $LD_{50} < 2$ sont classées comme toxiques, celles avec des $LD_{50} > 3$ sont classées comme non toxiques, Benrahou *et al.*, (2022) montrent que la LD_{50} étant supérieure à 2, peut être considérée comme ne présentant pas de risque de toxicité aiguë. Les valeurs LD_{50} des composants analysés varient entre 2,8 et 6,4 mg/L, suggérant qu'ils ne présentent pas de risques de toxicité aiguë.

Les produits chimiques interagissant avec les récepteurs nucléaires tels que les récepteurs des œstrogènes et des androgènes (ER et AR) en tant que non ciblées ou exposés dans l'environnement peuvent provoquer une perturbation endocrinienne. Ces produits chimiques, appelés perturbateurs endocriniens (EDC), peuvent interférer avec les fonctions normales de ces hormones stéroïdes endogènes et entraîner des conséquences néfastes sur la santé telles que la prolifération des tissus ou des organes, des troubles de la reproduction, des troubles métaboliques ou même des cancers (**Toporova et Balaguer, 2020**).

Concernant ce test, les résultats prédits suggèrent qu'aucun des molécules analysées n'est susceptible d'être un perturbateur androgénique. De même, la majorité des molécules sont prédites sans risque de perturbation des récepteurs d'œstrogènes (**Tableau 41**).

La mutation est essentielle dans le développement des cancers. La mutation des gènes suppresseurs de tumeurs, tels que p53, permet le développement de tumeurs. La protéine p53 permet la croissance cellulaire à un niveau normal et assure une protection contre le cancer. En tant que protéine suppresseur de tumeur, p53 est un régulateur intégral dans le développement de cancers. En fonctionnement normal, les stress cellulaires oncogènes provoquent le transport des signaux vers les protéines régulatrices centrales. Ces régulateurs de base modifient les niveaux de p53 en conséquence pour combattre le stress cellulaire. La protéine p53 elle-même se lie à aux séquences consensus de l'ADN, permettant la

transcription de gènes dépendants de p53 et déclenchant des transcriptions en aval qui conduisent à l'arrêt du cycle cellulaire, et à l'apoptose (Criddle, 2017). Un résultat positif indique que les molécules choisies peuvent altérer la protéine p53.

Certaines molécules ont présenté des risques d'inhibition d'altération de la protéine p53, ce qui peut avoir des conséquences sur le développement de quelques types de cancers liés à cette protéine (Tableau 41).

7. Simulation dynamique moléculaire

Sur la base des résultats de l'évaluation de la qualité stéréochimique des modèles enzymatiques prédits dans notre étude, la cible 3HNR a montré la stabilité et la fiabilité la plus élevée ce qui nous encourage à choisir cette enzyme avec les ligands actinomycétales comme systèmes récepteur-ligand potentiel dans l'analyse de la simulation dynamique moléculaire. Par conséquent, les cinq métabolites actinomycétales (Indole-3-carboxylic acid, Streptokordin, 3-Phenylpropionic acid, Phenylacetate et 8-Hydroxyquinoline) ayant donné les meilleurs résultats de l'analyse du docking moléculaire et qui ont répondu de manière satisfaisante aux tests ADMET ont été sélectionnés afin de vérifier leur stabilité au sein de l'enzyme 3HNR. Pour cela, la trajectoire de la simulation DM réalisée pendant les 50 ns a été analysée via un ensemble de paramètres. Le résultat de la simulation DM des complexes 3HNR_4-nitro-inden-1-one a été pris comme référence.

Tableau 42. Les valeurs moyennes de RMSD, RMSF, Rg, SASA et nombre de liaisons H pour les complexes étudiés.

Complexes	Moyenne RMSD (nm)	Moyenne RMSF (nm)	Moyenne Rg (nm)	Moyenne SASA (nm ²)	H-bond
3HNR_4-nitro-inden-1-one (référence)	0,23±0,03	0,09±0,08	1,84± 0,01	140,53±2,86	2
3HNR_indol-3-carboxylic	0,33±0,04	0,11±0,07	1,85± 0,09	141,08±3,01	1
3HNR_Streptokordin	0,23±0,03	0,09±0,08	1,86± 0,07	140,80±2,44	2
3HNR_phenylacetate	0,27±0,03	0,10±0,10	1,87±0,08	141,17±2,58	1
3HNR_8-Hydroxyquinoline	0,26±0,04	0,11±0,07	1,86±0,01	144,11±2,45	2
3HNR_3-Phenylpropionic	0,37±0,07	0,14±0,09	1,89±0,01	144,59 ±2,86	2

7.1.Écart quadratique moyen (RMSD)

Le RMSD du squelette des cinq complexes est représenté sur la **figure 58**. A l'exception du complexe acide 3HNR_3-phénylpropionique, l'analyse des trajectoires montre qu'un plateau

d'équilibre est atteint pour les cinq autres complexes après environ 15 ns. D'après les résultats obtenus, le complexe d'acide 3HNR_3-Phénylpropionique a montré une fluctuation de sa trajectoire à 6 ns, puis une stabilisation jusqu'à 16 ns, suivie d'autres fluctuations. De plus, ce complexe a donné une valeur RMSD moyenne de 0,37 nm (**Tableau 42**), ce qui en fait le moins stable parmi les complexes étudiés. Avec une RMSD moyenne de 0,23 nm, égale à celle du complexe de référence 3HNR_4-nitro-indène-1-one, le complexe 3HNR_Streptokordin a conservé la plus grande stabilité tout au long de la trajectoire. Les complexes 3HNR_8-Hydroxyquinoléine et 3HNR_phénylacétate ont montré des moyennes RMSD très proches du complexe de référence qui sont respectivement de 0,26 nm et 0,27 nm, suggérant la stabilité de ces complexes. Le complexe 3HNR_indol-3-carboxylique a donné une RMD moyenne de 0,33 nm, et a présenté une légère fluctuation vers 40 nm jusqu'à la fin de la trajectoire. Le graphique global de RMSD (**Figure 58a**) indique que l'interaction des ligands streptokordine, 8-hydroxyquinoline, phénylacétate avec le site actif de l'enzyme 3HNR n'a pas affecté la stabilité du squelette protéique.

7.2.Fluctuations quadratiques moyennes (RMSF)

RMSF est un autre paramètre clé dans l'évaluation de la stabilité des complexes analysés. Ce paramètre renseigne sur la flexibilité résiduelle de la protéine lors de son interaction avec le ligand. Une mobilité élevée est interprétée par une valeur élevée de fluctuation, suggérant que le segment protéique est faiblement stable, tandis qu'un RMSF faible reflète moins de mobilité, et donc plus de stabilité. Le graphique RMSF (**Figure 58b**) montre des fluctuations remarquables au début, ce qui est très probablement dû à la présence de boucles dans cette région de la protéine, ce qui rend les liaisons moins stables. Les valeurs RMSF moyennes des complexes 3HNR_Streptokordin, 3HNR_phénylacétate, 3HNR_acide indol-3-carboxylic, 3HNR_8-hydroxyquinoline et 3HNR_acide 3-phenylpropionic sont respectivement de 0,09 nm, 0,10 nm, 0,07, 0,11 nm et 0,07 nm (**Tableau 42**). Par rapport au complexe de référence, les fluctuations résultant de ces complexes varient de 0 à 0,02, ce qui traduit leur grande stabilité. Le complexe 3HNR_3-Phénylpropionique a donné une moyenne RMSF de 0,14 nm, suggérant qu'il est plus flexible par rapport aux complexes précédents.

7.3.Rayon de giration (Rg)

Le rayon de giration (Rg) est une mesure qui indique la compacité du complexe tout au long de la simulation MD. Lorsque ce facteur garde des valeurs relativement stables cela peut être interprété par la stabilité de la protéine, et inversement, si ce facteur présente des fluctuations

au cours de la simulation cela indique la déstabilisation de la structure. Le **tableau 42** montre que le complexe de référence 3HNR_4-nitro-indène-1-one, a donné un Rg moyen de 1,84 nm. Les complexes 3HNR_Streptokordin, 3HNR_8-hydroxyquinoline, 3HNR_Phenylacetate, 3HNR_acide indol-3-carboxylic et 3HNR_acide 3-phenylpropionic ont donné des Rg moyennes de 1,86 nm, 1,86 nm, 1,87, 1,85 et 1,89, respectivement. Ces valeurs très comparables à celle du complexe de référence confirment la stabilité de l'union entre ces ligands et l'enzyme 3HNR. La **figure 58** (c) montre que les tracés des complexes 3HNR_Streptokordin, 3HNR_phenylacetate et 3HNR_acide indol-3-carboxylic sont maintenus très stables tout au long de la trajectoire de simulation.

7.4.Surface accessible aux solvants (SASA)

SASA est une mesure qui représente la surface de la protéine en interaction avec le solvant, qui est l'eau dans notre cas. En d'autres termes, ce paramètre calcule la surface de la protéine accessible au solvant. Par conséquent, une faible valeur de SASA correspond à une structure protéique plus stable et plus rigide. Les résultats obtenus par cette analyse sont présentés sur la **figure 58** (d). À partir de ce graphique, nous pouvons remarquer que les trois complexes avec les valeurs SASA les plus basses sont 3HNR_Streptokordin, 3HNR_indol-3-carboxylic et 3HNR_phenylacetate. Ces trois complexes ont montré des moyennes SASA de 140,80 nm², 141,08 nm² et 141,17 nm² respectivement (**Tableau 42**), qui sont des valeurs très proches de celle du complexe de référence (140,35 nm²). Ainsi, il est bien évident que ces complexes sont relativement plus stables et compacts.

7.5.Liaisons hydrogène

La stabilisation du système protéine-ligand peut également être liée à la formation de liaisons hydrogène au sein de la poche catalytique. Les informations sur le nombre d'interactions hydrogène entre la protéine 3HNR et les ligands étudiés au cours de la trajectoire de simulation MD sont présentées dans la **figure 58** (e). D'après les informations recueillies à partir de cette analyse, il apparaît que tous les ligands étudiés forment des liaisons hydrogène avec des résidus clés du site actif de l'enzyme. Les ligands étudiés ont montré un nombre de liaisons hydrogène allant de 1 à 2 pendant les 50 ns de la simulation. De ces résultats, nous pouvons conclure que tous les ligands participent à la stabilisation du système en formant des liaisons hydrogène avec le récepteur.

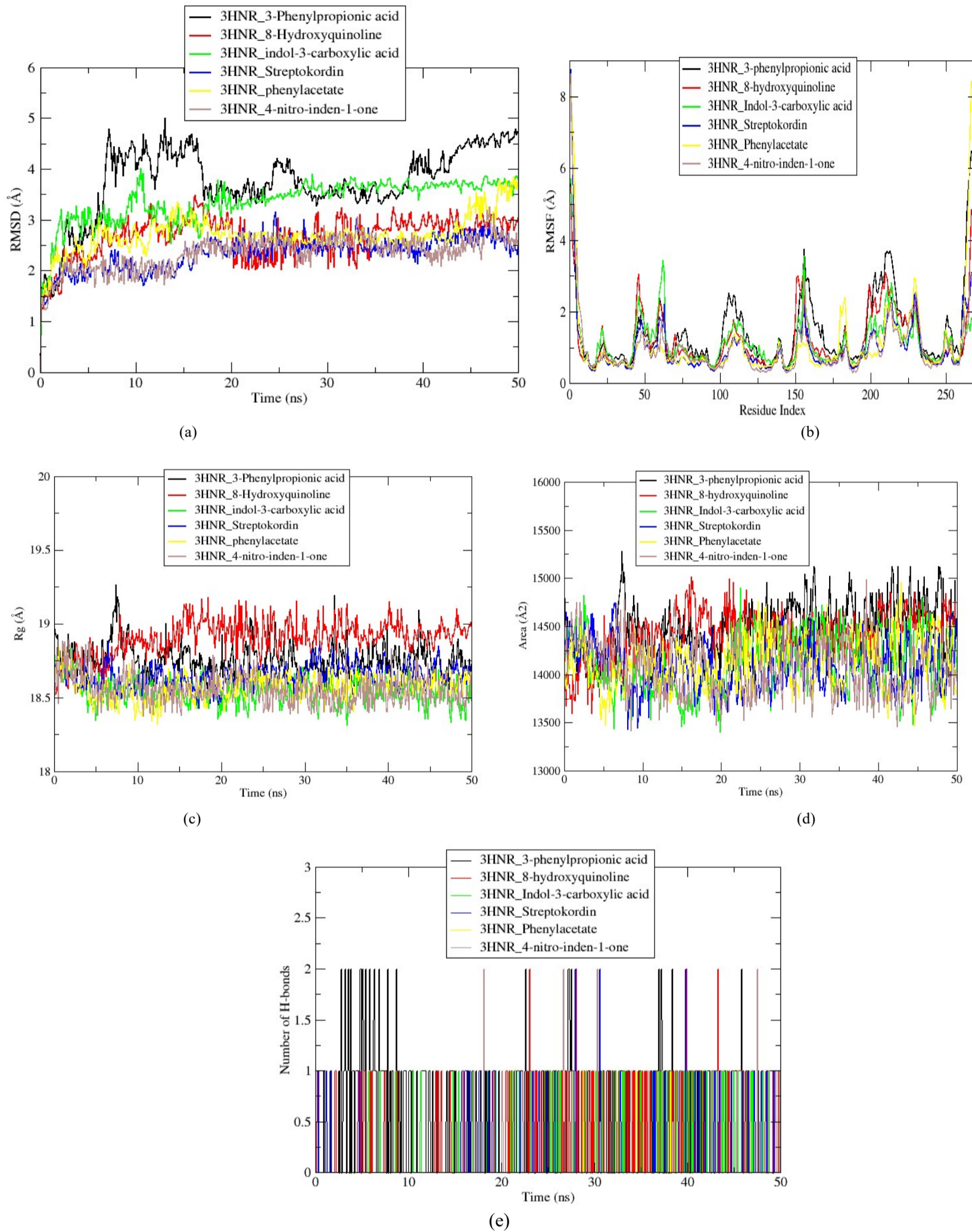


Figure 58. (a) RMSD des six complexes observés lors de la simulation à 50 ns (b) RMSF des six complexes lors de la simulation MD (c) Le rayon de giration des six complexes lors des simulations MD à 50 ns (d) SASA les six complexes observés lors de la simulation à 50 ns (e) Le nombre de liaisons H établies lors des simulations MD à 50 ns.

Conclusion générale et perspectives

La tomate est l'une des productions agricoles mondiales les plus importantes au monde. Cependant, les tomates sont sensibles à une variété d'agents pathogènes qui réduisent à la fois leur rendement et leur qualité. Parmi ces agents phytopathogènes les plus redoutables les espèces du genre *Alternaria*, agent de l'alternariose. Cette maladie se caractérise par la formation de lésions brun foncé et nécrose du tissu qui facilitent la croissance nécrotrophique du champignon en attaquant les feuilles, les tiges et les fruits.

Le contrôle de l'alternariose des tomates causées par les espèces d'*Alternaria* consiste à appliquer des fongicides chimiques synthétiques par pulvérisation. Cependant, de nombreux fongicides chimiques ont des effets secondaires négatifs, notamment la pollution de l'environnement, des dommages à la santé humaine et une perte d'efficacité due à une résistance accrue des agents pathogènes aux fongicides. Par conséquent, des alternatives aux fongicides chimiques sont recherchées pour la gestion de l'alternariose.

La lutte biologique est un grand espoir pour réduire l'utilisation des pesticides chimiques. Il s'agit souvent de microorganismes ou de leurs molécules bioactives qui agissent en interagissant soit avec la plante hôte, favorisant ainsi sa croissance et stimulant son immunité contre les agressions externes, ou avec des agents phytopathogènes en inhibant ou limitant leur développement et réduire ainsi leur impact négatif sur la plante hôte.

Dans leur action contre les phytopathogènes fongiques, les agents de biocontrôle microbiens adoptent différents mécanismes d'action qui varient de la compétition, le parasitisme et l'antibiose par la production et la sécrétion d'une large variété d'enzymes et métabolites secondaires à potentiel antifongique.

Au cours de cette présente étude, nous avons abordé le sujet de biocontrôle contre le phytopathogène *Alternaria* par l'évaluation de l'activité antifongique de quelques souches actinomycétales et fongiques isolées de sols agricoles comme possibles fournisseurs de molécules bioactives contre des souches *Alternaria* spp. isolées de tomates infectées. Pour atteindre notre objectif, les trois approches de criblage *in vitro*, *in planta* et *in silico* ont été utilisées.

Pour l'isolement des souches candidats de biocontrôle, nous avons choisi de faire des prélèvements de sols agricoles provenant de la Wilaya d'Oum El Bouaghi, à savoir les communes d'Ain Beida, Oum El Bouaghi et Ain Fakroun. Ceci nous a permis d'isoler 68

souches fongiques et 30 souches actinomycétales. De l'autre côté, des tomates infectées présentant des symptômes d'alternariose ont fait l'objet d'un isolement de 03 souches phytopathogènes nommées Tom1-3, qui ont été identifiées comme appartenant au genre *Alternaria* sur la base de leurs caractéristiques macro-microscopiques.

Pour cribler l'effet antagoniste des souches candidats contre les souches d'*Alternaria* spp., la méthode de confrontation directe sur gélose PDA était utilisée en premier lieu. Les résultats de cette méthode montrent que parmi un nombre total de 98 souches, 10 souches dont 9 champignons (Fun3, Fun7, Fun13, Fun18, Fun29, Fun32, Fun36, Fun37 et Fun42) et 1 actinomycétale (Act11) ont manifestées des résultats d'inhibition satisfaisantes contre les phytopathogènes *Alternaria*. Les pourcentages d'inhibition des souches actives varient entre 53,33% et 92%. Ces souches étaient alors sélectionnées pour des tests de criblage ultérieures.

L'identification des isolats actifs était basée sur leurs caractéristiques macro-microscopiques qui nous ont permis d'attribuer les souches fongiques aux genres *Aspergillus* (Fun13, Fun7, Fun29, Fun32, Fun36, Fun37 et Fun42) et *Penicillium* (Fun3 et Fun18). Alors que dans le cas de la souche actinomycétale, les informations obtenues ne permettent pas de la classer dans un niveau taxonomique particulier, car comme toute autre souche procaryote, sa taxonomie nécessite une analyse de l'ADNr 16S, mais une hypothèse a été faite sur son possible appartenance au genre *Streptomyces*.

Les souches performantes ont été également testées pour une multitude de capacités enzymatiques choisies sur la base de leur implication dans le processus de biocontrôle. La recherche des enzymes chitinase, protéase, amylase, cellulase, lipase, estérase, pectinase et laccase chez les souches prometteuses a permis la mise en évidence de leur potentiel enzymatique important, reflétant ainsi l'intérêt de ces souches comme agents de lutte biologique.

Dans un deuxième temps, des fermentations contrôlées ont été réalisées par l'inoculation des souches antagonistes. Les filtrats des fermentations sensés contenir les métabolites secondaires des isolats ont été testés pour leur effet inhibiteur contre les souches d'*Alternaria*. Pour ce fait, ces filtrats ont été additionnés à différentes concentrations (10%, 20% et 40%) au milieu PDA destiné à la culture d'*Alternaria*. Les résultats de ce test confirment l'hypothèse de l'effet inhibiteur des métabolites secondaires des souches antagonistes contre les souches pathogènes. Les pourcentages d'inhibition varient entre 3,70% et 87,76%. Les souches Fun3,

Fun18 et Fun42 ont montré les résultats les plus prometteurs. L'analyse statistique montre une différence significative entre les trois concentrations utilisées reflétant l'importance de la concentration des métabolites secondaires dans la lutte contre *Alternaria* sp.

Les filtrats des souches les plus performantes Fun3, fun18 et Fun42 ont été ensuite utilisées dans une expérience de criblage de leur activité antifongique *in planta* en utilisant des fruits de tomates comme modèle d'étude. Les résultats montrent que les filtrats testés étaient capables de réduire l'infection fongique des tomates totalement ou partiellement avec des pourcentages variants entre 55,56% à 100%.

Grâce à ces résultats, nous avons montré que la combinaison de protocoles *in vitro* et *in planta* est nécessaire afin d'affiner la sélection d'agents de lutte biologique efficaces contre *Alternaria* sp.

Comme conclusion de cette partie de notre étude, nous avons pu isoler et caractériser un nombre de 09 souches fongiques et une actinomycétale capables d'inhiber la croissance de 03 souches phytopathogènes d'*Alternaria* soit par contact directe avec ces derniers en employant un mécanisme de parasitisme soit par sécrétion d'enzymes ou de métabolites secondaires à effet antifongique. Parmi ces souches, les nommées Fun3, Fun18 et Fun42 attribuées aux genres *Penicillium*, *Penicillium* et *Aspergillus*, respectivement étaient à la fois performantes *in vitro* et *in planta* en limitant ou inhibant le développement des souches *Alternaria* sp. sur le tissu végétal.

Dans un autre volet de cette étude, un criblage *in silico* de l'activité antifongique d'un ensemble de métabolites secondaires fongiques et actinomycétales rassemblées de différentes sources de littérature a été réalisé. Pour ce fait, les neuf enzymes cystathionine bêta lyase, homoserine O-acétyltransférase, glutathione réductase, pecate lyase, scytalone déshydratase, thioredoxin peroxidase, thioredoxin réductase, 3HNR (1,3,8-trihydroxynaphthalene réductase) et 4HNR (1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene réductase) impliquées dans différents processus de virulence des espèces d'*Alternaria* ont été choisies comme cibles potentielles de l'activité inhibitrice des métabolites microbiennes candidats.

Les enzymes en question ont fait l'objet d'une modélisation homologue par le programme Modeller et une validation de leur qualité stéréochimique. En générale, les données rassemblées des différents outils d'évaluation confirment la fiabilité des modèles

prédits. Cependant, le modèle de l'enzyme 3HNR a montré le meilleur résultat parmi les enzymes modélisées.

Sur l'ensemble de 9 enzymes étudiées, tous les cibles ont présenté des valeurs RMSD parfaitement dans les normes ($< 2 \text{ \AA}$) en comparaison avec leurs meilleurs templates. PROCHECK a montré que les six enzymes thioredoxin peroxidase, glutathione reductase, scytalone déshydratase, cystathionine beta-lyase, 3HNR et 4HNR ont 90% des résidus dans les régions favorisées. Les résultats de Verify 3D montrent que les enzymes thioredoxin reductase, thioredoxin peroxidase, glutathione reductase, 3HNR et 4HNR ont des valeurs supérieures à 80%. ERRAT a montré que tous les modèles étudiés ont des valeurs supérieures à 50%. D'un autre côté, toutes les enzymes modélisées ont des valeurs de Z-score négatives reflétant la stabilité de leurs structures. Enfin, les résultats de l'analyse QMEANDisCo donnent des valeurs comprises entre 0 et 1 indiquant la bonne qualité des modèles étudiés.

Après l'évaluation et la validation des modèles, le site actif de chaque enzyme modélisée a été prédit par le serveur CastP, et confirmé par l'alignement des séquences et structures template-modèle correspondantes par PyMol.

Une investigation des interactions moléculaires établies entre les métabolites secondaires microbiens au sein des sites actifs des 9 enzymes modélisées a été ensuite réalisée par docking moléculaire en utilisant le programme Autodock-vina. Dans le cas où ils existent, les fongicides chimiques connus pour inhiber les enzymes étudiées ont été utilisés comme ligand de référence et seuls les métabolites ayant donné une énergie de liaison égale ou inférieure à celle de la molécule de référence ont été pris en considération, où une analyse plus profonde de leur mode d'interaction a été réalisée et visualisée par le programme Studio Discovery. Les interactions d'hydrogène, hydrophobe, Van der Waals ont été les principales interactions recherchées lors de l'interaction des métabolites microbiens avec les résidus des sites actifs des enzymes étudiées.

Dans un autre côté, les paramètres Drug-likeness et ADMET (absorption, digestion, métabolisme, excrétion et toxicité) des meilleurs métabolites ont été analysés afin de comprendre leur comportement dans le corps humain et vérifier leur non toxicité. Les résultats montrent que la majorité des molécules respectent les règles de drug likeness ; à savoir les filtres de Lipinski, Ghose, Veber, Egan et Muegge. Les résultats des propriétés ADMET montrent également que la majorité des ligands sélectionnés sont facilement absorbés par les

membranes biologiques et leur excrétion est généralement efficace. Alors que certains métabolites sont sans danger majeur sur le corps humain et animal où ils répondent négativement à une large variété de tests de toxicité biologique, d'autres par contre sont à manipuler avec précaution car leurs indices de toxicité sont parfois préoccupants.

Afin de confirmer la stabilité des meilleurs complexes amarrés récepteur-ligand, une simulation dynamique moléculaire de 50 ns a été réalisée en utilisant le programme NAMD. Vu la complexité de cette analyse en termes de temps et de capacité de la machine, seule l'enzyme modélisée 3HNR a été choisie sur la base de ses résultats de validation satisfaisants. Les métabolites actinomycétales donnant les meilleurs résultats du docking moléculaire et répondant positivement à l'analyse pharmacocinétique ont été choisis comme ligands potentiels. Ces molécules sont l'acide Indole-3-carboxylique, le streptokordin, l'acide 3-phenylpropionique, le phenylacetate, et 8-Hydroxyquinoline qui ont données des énergies de liaison de -6.1 kcal/mol, -6.1 kcal/mol, -5.4 kcal/mol, -5.3 kcal/mol, et -5.0 kcal/mol, respectivement. Les résultats du complexe de l'enzyme 3HNR avec son ligand co-cristallisé 4-nitro-inden-1-one ont été pris comme référence. Les résultats issus des analyses de RMSD, RMSF, rayon de giration (Rg), liaisons hydrogène et SASA ont confirmé la stabilité de ces métabolites lors de leurs interactions avec le site actif de l'enzyme 3HNR, avec une préférence pour le complexe 3HNR-Streptokordin.

En conclusion de cette partie, grâce à différentes analyses *in silico*, nous avons pu proposer un ensemble de métabolites secondaires fongiques et actinomycétales comme possibles candidats antifongiques contre l'activité de différentes enzymes clés impliquées dans le processus de virulence des souches de l'agent phytopathogène *Alternaria*. Ces métabolites peuvent faire l'objet d'une investigation plus profonde de leur activité antifongique et être exploités dans des études ultérieures pour le développement de nouvelles molécules de lutte biologique.

Enfin, afin de poursuivre notre chemin de recherche, ce modeste travail offre des perspectives variées, dont :

- L'identification moléculaire des agents antagonistes présentant une activité antifongique importante.
- L'identification moléculaire des souches phytopathogènes d'*Alternaria*

- L'extraction, la purification et l'identification des molécules antifongiques des souches performantes pour mieux comprendre le mécanisme d'antagonisme employé par chaque souche.
- La validation du potentiel antifongique des souches performantes par leur application sur des plantes cultivées dans une parcelle agricole pour mieux comprendre l'influence des facteurs biotiques et abiotiques sur leur effet antagoniste.
- La réalisation d'analyses de simulation dynamique moléculaire pour les autres enzymes cibles afin de confirmer la stabilité de leur interaction avec les ligands microbiens.
- L'exploitation des résultats obtenus par l'analyse *in silico* sur les métabolites les plus performants en termes d'activité antifongique par leur application dans des essais *in vitro* et *in planta*.

Références bibliographiques

- Aamir, M., Singh, V. K., Dubey, M. K., Meena, M., Kashyap, S. P., Katari, S. K., Upadhyay, R.S., Umamaheswari, A., and Singh, S. (2018). In silico prediction, characterization, molecular docking, and dynamic studies on fungal SDRs as novel targets for searching potential fungicides against Fusarium wilt in tomato. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1038.
- Abbott, S. L. (2011). Klebsiella, enterobacter, citrobacter, serratia, plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae. In *Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition* (pp. 639-657). American Society of Microbiology.
- Abdallah, D. B., Tounsi, S., Gharsallah, H., Hammami, A., and Frikha-Gargouri, O. (2018). Lipopeptides from Bacillus amyloliquefaciens strain 32a as promising biocontrol compounds against the plant pathogen Agrobacterium tumefaciens. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(36), 36518-36529.
- Abdel-Mallek, A. Y., Hemida, S. K., and Bagy, M. M. K. (1995). Studies on fungi associated with tomato fruits and effectiveness of some commercial fungicides against three pathogens. *Mycopathologia*, 130(2), 109-116.
- Abdul-Hammed, M., Adedotun, I. O., Falade, V. A., Adepoju, A. J., Olasupo, S. B., and Akinboade, M. W. (2021). Target-based drug discovery, ADMET profiling and bioactivity studies of antibiotics as potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease (Mpro). *VirusDisease*, 32(4), 642-656.
- Achetbi, H., Amiri, S., and Lahlali, R. (2021). Les Alternarioses (*Alternaria* spp.) des agrumes : Diagnostic et méthodes de lutte. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 9(2).
- Adebisi, M., and Olugbara, O. (2021). Homology Modeling of CYP6Z3 Protein of Anopheles Mosquito. *Advances in Science, Technology and Engineering Systems Journal*, 6(2), 580-585.
- Adhikari, P., Oh, Y., and Panthee, D. R. (2017). Current status of early blight resistance in tomato: an update. *International journal of molecular sciences*, 18(10), 2019.
- Admassie, M., Alemu, T., and Mulatu, A. (2019). Microbial biocontrol by Trichoderma, its biological interactions and mode of actions. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 31(1).

- Agrawal, T., and Kotasthane, A. S. (2012). Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *SpringerPlus*, 1(1), 1-10.
- Ahmad, A., Iliyasu, M. Y., Na'Allah, A. J., Olawale, B. I., Madika, A., and Umar, A. F. (2021). Screening of Soil Fungi for Cellulase Production using Carboxymethyl Cellulose Media. *Path of Science*, 7(12), 1006-1011.
- Al-Agamy, M. H., Alhuzani, M. R., Kelany, M. S., and Hamed, M. M. (2021). Production and partial characterization of α -amylase enzyme from marine actinomycetes. *BioMed Research International*, 2021.
- Ali, S. R., Fradi, A. J., and Al-Aaraji, A. M. (2016). Comparison between different cultural medium on the growth of five *Aspergillus* species. *World J. Pharm. Res*, 5(8), 09â.
- Allen, C. H., Koutsoukas, A., Cortés-Ciriano, I., Murrell, D. S., Malliavin, T. E., Glen, R. C., and Bender, A. (2016). Improving the prediction of organism-level toxicity through integration of chemical, protein target and cytotoxicity qHTS data. *Toxicology research*, 5(3), 883-894.
- Almi, Z., Belaidi, S., Lanez, T., and Tchouar, N. (2014). Structure Activity Relationships, QSAR Modeling and Drug-like calculations of TP inhibition of 1, 3, 4-oxadiazoline-2-thione Derivatives. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*, 18, 113-124.
- Almowallad, S. A., Alshammari, G. M., Alsayadi, M. M., Aljafer, N., Al-Sanea, E. A., Yahya, M. A., and Al-Harbi, L. N. (2022). Partial Purification and Characterization of Exo-Polygalacturonase Produced by *Penicillium oxalicum* AUMC 4153. *Life*, 12(2), 284.
- Al-Saadi, A., Hameed, N., and Jaralla, E. M. (2013). Isolation and Identification of *Streptomyces* from different sample of soils. *Journal of Biology and Medical Sciences*, 1.
- Alves, T. B., de Oliveira Ornela, P. H., de Oliveira, A. H. C., Jorge, J. A., and Guimarães, L. H. S. (2018). Production and characterization of a thermostable antifungal chitinase secreted by the filamentous fungus *Aspergillus niveus* under submerged fermentation. *3 Biotech*, 8(8), 1-10.
- Amin, D. H., Abdallah, N. A., Abolmaaty, A., Tolba, S., and Wellington, E. M. (2020). Microbiological and molecular insights on rare *Actinobacteria* harboring bioactive prospective. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 1-12.
- Anandan, R., Dharumadurai, D., and Manogaran, G. P. (2016). An introduction to actinobacteria. In *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*. IntechOpen.

- Andersen, B., Nielson, K. F., Fernandez, P. V., and Patriarca, A. (2015). Characterization of *Alternaria* strains from Argentinean blackberry, tomato, walnut and wheat. *Int. J. Food Microbiol.* 196, 1–10. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.029
- Andersson, A., Jordan, D., Schneider, G., and Lindqvist, Y. (1996). Crystal structure of the ternary complex of 1, 3, 8-trihydroxynaphthalene reductase from *Magnaporthe grisea* with NADPH and an active-site inhibitor. *Structure*, 4(10), 1161-1170.
- Angelia, C., Sanjaya, A., Aida, A., Tanudjaja, E., Victor, H., Cahyani, A. D., Tan, T.J., and Pinontoan, R. (2019). Characterization of alpha-amylase from *Aspergillus niger* aggregate F isolated from a fermented cassava gatot grown in potato peel waste medium. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 47(3), 364-371.
- Arfaoui, A., Sifi, B., Boudabous, A., Hadrami, I. E., and Cherif, M. (2006). Identification of *Rhizobium* isolates possessing antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, the causal agent of Fusarium wilt of chickpea. *Journal of Plant Pathology*, 67-75.
- Arora, D. K. (1986). Chemotaxis of *Actinoplanes missouriensis* zoospores to fungal conidia, chlamydospores and sclerotia. *Microbiology*, 132(6), 1657-1663.
- Arora, N. K., Kang, S. C., and Maheshwari, D. K. (2001). Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. *Current Science*, 673-677.
- Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C. E., Herrera de Los Santos, M., and Valdez-Cruz, N. A. (2019). Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 1-33.
- Arthur, D. E., and Uzairu, A. (2019). Molecular docking studies on the interaction of NCI anticancer analogues with human Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit. *Journal of King Saud University-Science*, 31(4), 1151-1166.
- Atanasova, L., Dubey, M., Grujić, M., Gudmundsson, M., Lorenz, C., Sandgren, M., Kubicek, C.P., Jensen, D.F., and Karlsson, M. (2018). Evolution and functional characterization of pectate lyase PEL12, a member of a highly expanded *Clonostachys rosea* polysaccharide lyase 1 family. *BMC microbiology*, 18(1), 1-19.
- Atkins, P., and De Paula, J. (2011). *Physical chemistry for the life sciences*. Oxford University Press, USA.

- Ausaf A. S., Hassan, I., Islam, A., and Ahmad, F. (2014). A review of methods available to estimate solvent-accessible surface areas of soluble proteins in the folded and unfolded states. *Current Protein and Peptide Science*, 15(5), 456-476.
- Baggio, L. M., Panagio, L. A., Gasparin, F. G. M., Sartori, D., Celligoi, M. A. P. C., and Baldo, C. (2019). Production of fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes by a strain of *Penicillium* sp. isolated from contaminated soil with industrial effluent. *Acta Scientiarum. Health Sciences*, 41, 40606.
- Bahar, M., Pervez, M. T., Ali, A., and Babar, M. E. (2019). In silico analysis of hepatitis B virus genotype D subgenotype D1 circulating in Pakistan, China, and India. *Evolutionary Bioinformatics*, 15, 1176934319861337.
- Bais, H. P., Fall, R., and Vivanco, J. M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant physiology*, 134(1), 307-319
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., Clement, C., Ouhdouch, Y., and van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- Baron, N. C., Rigobelo, E. C., and Zied, D. C. (2019). Filamentous fungi in biological control: current status and future perspectives. *Chilean journal of agricultural research*, 79(2), 307-315.
- Bawazir, A. M. A., and Shantaram, M. (2018). Ecology and distribution of actinomycetes in nature—a review. *International Journal of Current Research*, 10(7), 71664-71668.
- Beg, M., Thakur, S. C., and Meena, L. S. (2018). Structural prediction and mutational analysis of Rv3906c gene of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv to determine its essentiality in survival. *Advances in Bioinformatics*, 2018.
- Belay, A., Claassens, A., and Wehner, F. C. (2002). Effect of direct nitrogen and potassium and residual phosphorus fertilizers on soil chemical properties, microbial components and maize yield under long-term crop rotation. *Biology and Fertility of Soils*, 35(6), 420-427.
- Bell, A. A., and Wheeler, M. H. (1986). Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annualreview of phytopathology*, 24(1), 411-451.

- Belozerskaya, T. A., Gessler, N. N., and Aver'yanov, A. A. (2017). Melanin pigments of fungi. *Fungal metabolites*, 263-291.
- Benali, F., and Ramdani, N. (2021). Influence of ozonised irrigation water on the morphological, bacteriological and sensory characteristics of 'Saint-Pierre' tomatoes grown in Algeria. *Acta agriculturae Slovenica*, 117(4), 1-10.
- Benedetti, M., Locci, F., Gramegna, G., Sestili, F., and Savatin, D. V. (2019). Green production and biotechnological applications of cell wall lytic enzymes. *Applied Sciences*, 9(23), 5012.
- Benhadj, M., Gacemi-Kirane, D., Menasria, T., Guebla, K., and Ahmane, Z. (2019). Screening of rare actinomycetes isolated from natural wetland ecosystem (Fetzara Lake, northeastern Algeria) for hydrolytic enzymes and antimicrobial activities. *Journal of King Saud University-Science*, 31(4), 706-712.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., and Codon, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. *International microbiology*, 7(4), 249-260.
- Benkert, P., Biasini, M., and Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), 343-350.
- Benkert, P., Tosatto, S. C., and Schomburg, D. (2008). QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 71(1), 261-277.
- Benrahou, K., Mrabti, H. N., Assaggaf, H. M., Mortada, S., Salhi, N., Rouas, L., El Bacha, R., Dami, A., Masrar, A., Alshahrani, M. M., Awadh, A. A. A., Bouyahya, A., Goh, K. W., Ming, L. C., Cherrah, Y., and Faouzi, M. E. A. (2022). Acute and Subacute Toxicity Studies of Erodium guttatum Extracts by Oral Administration in Rodents. *Toxins*, 14(11), 735.
- Boratyn, G. M., Schäffer, A. A., Agarwala, R., Altschul, S. F., Lipman, D. J., and Madden, T. L. (2012). Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. *Biology direct*, 7(1), 1-14.
- Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, 58(1), 1-26.
- Berestetskiy, A. O. (2008). A review of fungal phytotoxins: from basic studies to practical use. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(5), 453-465.
- Berg, G., Marten, P., Minkwitz, A., and Bruckner, S. (2001). Efficient biological control of fungal plant diseases by Streptomyces sp. DSMZ 12424/Effiziente biologische Bekämpfung pilzlicher Pflanzenkrankheiten durch Streptomyces sp. DSMZ 12424. *Zeitschrift*

für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection, 1-10.

- Berger, S., Van Wees, S., Nybroe, O., and Großkinsky, D. K. (2020). Cross-frontier communication: phytohormone functions at the plant-microbe interface and beyond. *Frontiers in Plant Science*, 11, 386.
- Bernal, P., Allsopp, L. P., Filloux, A., and Llamas, M. A. (2017). The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens. *The ISME journal*, 11(4), 972-987.
- Bessadat, N., Hamon, B., Bataille-Simoneau, N., Mabrouk, K., and Simoneau, P. (2020). *Alternaria telliensis* sp. nov., a new species isolated from Solanaceae in Algeria. *Phytotaxa*, 440(2), 89-100.
- Bessadat, N., Simoneau, P., Benichou, S., Setti, B., Kihal, M., and Henni, D. E. (2014). Morphological, physiological and pathogenic variability of small-spore *Alternaria* sp. causing leaf blight of Solanaceous plants in Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, 8(37), 3422-3434.
- Bhaskar, N., Sudeepa, E. S., Rashmi, H. N., and Selvi, A. T. (2007). Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. *Bioresource Technology*, 98(14), 2758-2764.
- Bhatti, A. A., Haq, S., and Bhat, R. A. (2017). Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial pathogenesis*, 111, 458-467.
- Billones, R. K. C., Calilung, E. J., Dadios, E. P., and Santiago, N. (2020, December). *Aspergillus* Species Fungi Identification Using Microscopic Scale Images. In *2020 IEEE 12th International Conference on Humanoid, Nanotechnology, Information Technology, Communication and Control, Environment, and Management (HNICEM)* (pp. 1-5). IEEE.
- Binkowski, T. A., Naghibzadeh, S., and Liang, J. (2003). CASTp: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic acids research*, 31(13), 3352-3355.
- Biovia, D. S. (2017). BIOVIA Discovery Studio 2017 R2: A comprehensive predictive science application for the Life Sciences. *San Diego, CA, USA* <http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio>.
- Bouillant, M. L., Miché, L., Ouedraogo, O., Alexandre, G., Jacoud, C., Sallé, G., and Bally, R. (1997). Inhibition of *Striga* seed germination associated with sorghum growth promotion by soil bacteria. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, 320(2), 159-162.

- Bourne, J. M., Kerry, B. R., and De Leij, F. A. A. M. (1996). The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. and the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. *Biocontrol Science and Technology*, 6(4), 539-548.
- Breitinger, U., Clausen, T., Ehlert, S., Huber, R., Laber, B., Schmidt, F., Pohl, E., and Messerschmidt, A. (2001). The three-dimensional structure of cystathionine β -lyase from *Arabidopsis* and its substrate specificity. *Plant physiology*, 126(2), 631-642
- Brglez, A., Piškur, B., and Ogris, N. (2020). In vitro interactions between *Eutypella parasitica* and some frequently isolated fungi from the wood of the dead branches of young sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*). *Forests*, 11(10), 1072.
- Brooijmans, N., and Kuntz, I. D. (2003). Molecular recognition and docking algorithms. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 32(1), 335-373.
- Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S. L., Lorito, M., Kubicek, C. P., and Mach, R. L. (2005). Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(7), 3959-3965.
- Brunskole Švegelj, M., Turk, S., Brus, B., Lanišnik Rižner, T., Stojan, J., and Gobec, S. (2011). Novel inhibitors of trihydroxynaphthalene reductase with antifungal activity identified by ligand-based and structure-based virtual screening. *Journal of chemical information and modeling*, 51(7), 1716-1724.
- Brzezinska, M. S., and Jankiewicz, U. (2012). Production of antifungal chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and its potential role in the biological control. *Current microbiology*, 65(6), 666-672.
- Bucao, X. E. N., and Solidum, J. N. (2022). In Silico Evaluation of Antidiabetic Activity and ADMET Prediction of Compounds from *Musa acuminata* Colla Peel. *Philippine Journal of Science*, 151(1), 171-192.
- Buchenauer, H. (1998). Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria/Biologische Bekämpfung von bodenbürtigen Krankheiten durch Rhizobakterien. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 329-348.

- Calabrese, B. (2018). Cloud-Based Molecular Modeling Systems. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics*, 261.
- Cardoso, R. A., Pires, L. T. A., Zucchi, T. D., Zucchi, F. D., and Zucchi, T. M. A. D. (2010). Mitotic crossing-over induced by two commercial herbicides in diploid strains of the fungus *Aspergillus nidulans*. *Gen Mol Res*, 9, 231-238.
- Carrascal-Hernández, D. C., Flórez-López, E., Peralta-Ruiz, Y., Chaves-López, C., and Grande-Tovar, C. D. (2022). Eco-Friendly Biocontrol Strategies of *Alternaria* Phytopathogen Fungus: A Focus on Gene-Editing Techniques. *Agriculture*, 12(10), 1722.
- Carvalho, J. K., Panatta, A. A. S., Silveira, M. A. D., Tav, C., Johann, S., Rodrigues, M. L. F., and Martins, C. V. B. (2021). Yeasts isolated from a lotic continental environment in Brazil show potential to produce amylase, cellulase and protease. *Biotechnology Reports*, 30, e00630.
- Chabasse, D., Penn, P., Cimon, B., Bouchara, J., De Gentile, L., and Brun, S. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale.
- Chahal, V., Nirwan, S., and Kakkar, R. (2020). 5 Combined approach of homology modeling, molecular dynamics, and docking: computeraided drug discovery. In *Computational Chemistry Methods* (pp. 63-88). De Gruyter.
- Chaiharn, M., Theantana, T., and Pathom-aree, W. (2020). Evaluation of Biocontrol Activities of *Streptomyces* spp. against Rice Blast Disease Fungi. *Pathogens*, 9(2), 126.
- Chakraborty, U., Chakraborty, B. N., and Chakraborty, A. P. (2010). Influence of *Serratia marcescens* TRS-1 on growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* against *Fomes lamaoensis*. *Journal of Plant Interactions*, 5(4), 261-272.
- Chanclud, E., and Morel, J. B. (2016). Plant hormones: a fungal point of view. *Molecular plant pathology*, 17(8), 1289-1297.
- Chandra Behera, B., Kumar Sethi, B., Mohapatra, S., Thatoi, H., and Ranjan Mishra, R. (2021). Bio-production of alkaline protease by *Trichoderma longibrachiatum* and *Penicillium rubidurum* using different agro-industrial products. *Novel Research in Microbiology Journal*, 5(3), 1241-1255.
- Chandra, N., and Tyagi, V. K. (2013). Synthesis, properties, and applications of aminoacids based surfactants: a review. *Journal of dispersion science and technology*, 34(6), 800-808.

- Charest, M. H., Beauchamp, C. J., and Antoun, H. (2005). Effects of the humic substances of de-inking paper sludge on the antagonism between two compost bacteria and *Pythium ultimum*. *FEMS microbiology ecology*, 52(2), 219-227
- Charousová, I., Medo, J., Hleba, L., Císarová, M., and Javoreková, S. (2019). Antimicrobial activity of actinomycetes and characterization of actinomycin-producing strain KRG-1 isolated from Karoo, South Africa. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55.
- Chaudhary, K. K., and Mishra, N. (2016). A review on molecular docking: novel tool for drug discovery. *databases*, 3(4).
- Chaurasia, A., Meena, B. R., Tripathi, A. N., Pandey, K. K., Rai, A. B., and Singh, B. (2018). Actinomycetes: an unexplored microorganism for plant growth promotion and biocontrol in vegetable crops. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(9), 1-16.
- Chen, G., Huang, K., Miao, M., Feng, B., and Campanella, O. H. (2019). Molecular dynamics simulation for mechanism elucidation of food processing and safety: State of the art. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 18(1), 243-263.
- Chen, J., Wang, X., Tang, D., and Wang, W. (2019). Oxidative stress adaptation improves the heat tolerance of *Pseudomonas fluorescens* SN15-2. *Biological Control*, 138, 104070.
- Cheng, A., and Dixon, S. L. (2003). In silico models for the prediction of dose-dependent human hepatotoxicity. *Journal of computer-aided molecular design*, 17(12), 811-823.
- Cherkupally, R., Amballa, H., and Reddy, B. N. (2017). In vitro screening for enzymatic activity of *Trichoderma* species for biocontrol potential. *Ann. Plant Sci*, 6, 1784-1789.
- Chernin, L., Ismailov, Z., Haran, S., and Chet, I. (1995). Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(5), 1720-1726.
- Chet, I., and Inbar, J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Applied biochemistry and biotechnology*, 48(1), 37-43.
- Cho, Y., Jang, M., Srivastava, A., Jang, J. H., Soung, N. K., Ko, S. K., Kang, D., Ahn, J. S., and Kim, B. Y. (2015). A pectate lyase-coding gene abundantly expressed during early stages of infection is required for full virulence in *Alternaria brassicicola*. *PLoS One*, 10(5), e0127140.

- Chou, P. Y., and Fasman, G. D. (1978). Empirical predictions of protein conformation. *Annual review of biochemistry*, 47(1), 251-276.
- Choudhary, D. K., and Johri, B. N. (2009). Basidiomycetous yeasts: current status. In *Yeast biotechnology: diversity and applications* (pp. 19-46). Springer, Dordrecht.
- Clardy, J., Fischbach, M. A., and Walsh, C. T. (2006). New antibiotics from bacterial natural products. *Nature biotechnology*, 24(12), 1541-1550.
- Clausen, T., Huber, R., Laber, B., Pohlenz, H. D., and Messerschmidt, A. (1996). Crystal Structure of the Pyridoxal-5'-phosphate Dependent Cystathionine β -lyase from *Escherichia coli* at 1.83 Å. *Journal of molecular biology*, 262(2), 202-224.
- Cleland, W. W. (2010). The low-barrier hydrogen bond in enzymic catalysis. *Advances in Physical Organic Chemistry*, 44, 1-17.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., and Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International journal of food microbiology*, 71(1), 1-20.
- Coimbra, J. T., Feghali, R., Ribeiro, R. P., Ramos, M. J., and Fernandes, P. A. (2021). The importance of intramolecular hydrogen bonds on the translocation of the small drug piracetam through a lipid bilayer. *RSC Advances*, 11(2), 899-908.
- Colovos, C., and Yeates, T. O. (1993). Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein science*, 2(9), 1511-1519.
- Cook, R. J. (1993). Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual review of phytopathology*, 31(1), 53-80.
- Copping, L. G., and Duke, S. O. (2007). Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Management Science : formerly Pesticide Science*, 63(6), 524-554.
- Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D.C., Fox, T., Caldwell, J.W., and Kollman, P. A. (1995). A second-generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 117(19), 5179-5197.
- Costa, F. G., Zucchi, T. D., and Melo, I. S. D. (2013). Biological control of phytopathogenic fungi by endophytic actinomycetes isolated from maize (*Zea mays*

L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(6), 948-955.

- Creze, C., Castang, S., Derivery, E., Haser, R., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Shevchik, V. E., and Gouet, P. (2008). The crystal structure of pectate lyase peli from soft rot pathogen *Erwinia chrysanthemi* in complex with its substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 283(26), 18260-18268.
- Criddle, M. P. (2017). Computational investigation of the DNA binding domain of p53: a drive towards novel therapeutics (*Doctoral dissertation, University of Southampton*).
- Czyski, A. (2019). Determination of the lipophilicity of ibuprofen, naproxen, ketoprofen, and flurbiprofen with thin-layer chromatography. *Journal of Chemistry*, 2019.
- Dahdah, K., Nourine, H., Boughambouz, A., Sebti, S., Bouchaala, L., and Nabti, E. H. (2021). Isolation and Screening of Antagonistic Actinomycetes for Potential Application in The Control of Pathogenic Bacteria in Contaminated Waste.
- Dalmastrì, C., Chiarini, L., Cantale, C., Bevivino, A., and Tabacchioni, S. (1999). Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated Burkholderia cepacia populations. *Microbial Ecology*, 38(3), 273-284.
- Dang, H. X., Pryor, B., Peever, T., and Lawrence, C. B. (2015). The *Alternaria* genomes database: a comprehensive resource for a fungal genus comprised of saprophytes, plant pathogens, and allergic species. *BMC Genomics* 16 :239. Doi : 10.1186/s12864-015-1430-7
- Dar, G. H., Kamili, A. N., Nazir, R., Bandh, S. A., Jan, T. R., and Chishti, M. Z. (2015). Enhanced production of α -amylase by *Penicillium chrysogenum* in liquid culture by modifying the process parameters. *Microbial pathogenesis*, 88, 10-15.
- Das, K., Prasanna, R., and Saxena, A. K. (2017). Rhizobia: a potential biocontrol agent for soilborne fungal pathogens. *Folia microbiologica*, 62(5), 425-435.
- Daudert, D. G. (2018). Exploring the Impact of Pretrained Bidirectional Language Models on Protein Secondary Structure Prediction.
- Davies, J. (2006). Are antibiotics naturally antibiotics? *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(7), 496-499.
- De Guillen, K., Ortiz-Vallejo, D., Gracy, J., Fournier, E., Kroj, T., and Padilla, A. (2015). Structure analysis uncovers a highly diverse but structurally conserved effector family in phytopathogenic fungi. *PLoS pathogens*, 11(10), e1005228.

- De Menezes, A. B., McDonald, J. E., Allison, H. E., and McCarthy, A. J. (2012). Importance of Micromonospora spp. as colonizers of cellulose in freshwater lakes as demonstrated by quantitative reverse transcriptase PCR of 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(9), 3495-3499.
- De Simeis, D., and Serra, S. (2021). Actinomycetes: A never-ending source of bioactive compounds—An overview on antibiotics production. *Antibiotics*, 10(5), 483.
- Devanshi, S., Shah, K. R., Arora, S., and Saxena, S. (2021). Actinomycetes as An Environmental Scrubber. In *Crude Oil-New Technologies and Recent Approaches*. IntechOpen.
- Devi, L. S., Khaund, P., Nongkhlaw, F. M., and Joshi, S. R. (2012). Diversity of culturable soil micro-fungi along altitudinal gradients of Eastern Himalayas. *Mycobiology*, 40(3), 151-158.
- Devkota, P., Kloepper, J. W., Enebak, S. A., and Eckhardt, L. G. (2020). Towards biocontrol of ophiostomatoid fungi by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology*, 30(1), 19-32.
- Dey, F., and Caflisch, A. (2008). Manual for GANDI Genetic Algorithm-based de Novo Design of Inhibitors. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 48(3), 679-690.
- Dhurigai, N., Daniel, R. R., and Auxilia, L. R. (2014). Structure determination of leghemoglobin using homology modeling. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 3, 177-187.
- Di Muzio, E., Toti, D., and Polticelli, F. (2017). DockingApp: a user-friendly interface for facilitated docking simulations with AutoDock Vina. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 31(2), 213-218.
- Dias, R., de Azevedo, J., and Walter, F. (2008). Molecular docking algorithms. *Current drug targets*, 9(12), 1040-1047.
- Dilip, C. V., Mulaje, S. S., and Mohalkar, R. Y. (2013). A review on actinomycetes and their biotechnological application. *International Journal of pharmaceutical sciences and research*, 4(5), 1730.
- Djonović, S., Pozo, M. J., Dangott, L. J., Howell, C. R., and Kenerley, C. M. (2006). Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(8), 838-853.

- Dong, X., Fang, L., Ye, Z., Zhu, G., Lai, Q., and Liu, S. (2021). Screening of biocontrol bacteria against soft rot disease of *Colocasia esculenta* (L.) schott and its field application. *Plos one*, *16*(7), e0254070.
- Doty, S. L. (2013). Endophytic yeasts: biology and applications. In *Symbiotic Endophytes* (pp. 335-343). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Dowsland, K. A., and Thompson, J. (2012). Simulated annealing. *Handbook of natural computing*, 1623-1655.
- Du, R., Zhao, F., Qiao, X., Song, Q., Ye, G., Wang, Y., and Zhou, Z. (2018). Optimization and partial characterization of ca-independent α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* BH1. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *48*(8), 768-774.
- Duarte, C. F. D., Cecato, U., Biserra, T. T., Mamédio, D., and Galbeiro, S. (2020). *Azospirillum* spp. in grasses and forages. Review. *Rev Mex Cienc Pecu*, *11*(1), 223-240.
- Dullah, S., Hazarika, D. J., Goswami, G., Borgohain, T., Ghosh, A., Barooah, M., Bhattacharyya, A., and Boro, R. C. (2021). Melanin production and laccase mediated oxidative stress alleviation during fungal-fungal interaction among basidiomycete fungi. *IMA fungus*, *12*(1), 1-17.
- Durán-Iturbide, N. A., Díaz-Eufracio, B. I., and Medina-Franco, J. L. (2020). In silico ADME/Tox profiling of natural products: A focus on BIOFACQUIM. *ACS omega*, *5*(26), 16076-16084.
- Durrant, W. E., and Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual review of phytopathology*, *42*(1), 185-209.
- Dwivedi, S. K., and Enespa, S. (2013). In vitro efficacy of some fungal antagonists against *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causing brinjal and tomato wilt. *International journal of Biological & Pharmaceutical Research*, *4*(1), 46-52.
- Dyakov, Y. T. (2007). Overview on parasitism. In *Comprehensive and Molecular Phytopathology* (pp. 3-17). Elsevier.
- Ebalunode, J., and Zheng, W. (2010). Molecular shape technologies in drug discovery: methods and applications. *Current topics in medicinal chemistry*, *10*(6), 669-679.
- Ebersberger, I., de Matos Simoes, R., Kupczok, A., Gube, M., Kothe, E., Voigt, K., and Von Haeseler, A. (2012). A consistent phylogenetic backbone for the fungi. *Molecular biology and evolution*, *29*(5), 1319-1334.

- Ebrahimi-Zarandi, M., Saberi Riseh, R., and Tarkka, M. T. (2022). Actinobacteria as Effective Biocontrol Agents against Plant Pathogens, an Overview on Their Role in Eliciting Plant Defense. *Microorganisms*, 10(9), 1739.
- Effmert, U., Kalderás, J., Warnke, R., and Piechulla, B. (2012). Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *Journal of chemical ecology*, 38(6), 665-703.
- Egan, W. J., Merz, K. M., and Baldwin, J. J. (2000). Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *Journal of medicinal chemistry*, 43(21), 3867-3877.
- Egbuta, M. A., Mwanza, M., and Babalola, O. O. (2016). A review of the ubiquity of ascomycetes filamentous fungi in relation to their economic and medical importance. *Advances in Microbiology*, 6(14), 1140-1158.
- Eisenberg, D., Lüthy, R., and Bowie, J. U. (1997). [20] VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. In *Methods in enzymology* (Vol. 277, pp. 396-404). Academic Press.
- Eisenman, H. C., and Casadevall, A. (2012). Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(3), 931-940.
- El Gamal, N. G., Atalla, S. M., El-mougy, N. S., and Abdel-Kader, M. M. (2018). Production of pectinase by *Saccharomyces cerevisiae* and its application as biocontrol agent against navel orange and apple fruits decay. *BIOSCIENCE RESEARCH*, 15(4), 4136-4147.
- Elad, Y., and Kapat, A. (1999). The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of plant pathology*, 105(2), 177-189.
- El-Enshasy, H. A. (2007). Filamentous fungal cultures—process characteristics, products, and applications. *Bioprocessing for value-added products from renewable resources*, 225-261.
- El-Shamy, N. T., Alkaoud, A. M., Hussein, R. K., Ibrahim, M. A., Alhamzani, A. G., and Abou-Krishna, M. M. (2022). DFT, ADMET and Molecular Docking Investigations for the Antimicrobial Activity of 6,60 -Diamino-1,10 ,3,30 - tetramethyl-5,50 -(4-chlorobenzylidene) bis [pyrimidine-2,4(1H,3H)- dione]. *Molecules*, 27, 620. <https://doi.org/10.3390/molecules27030620>
- El-Shora, H. M., Youssef, M. M., and Khalaf, S. A. (2008). Inducers and inhibitors of laccase from *Penicillium*. *Biotechnology*, 7(1), 35-42.

- Elsliger, M. A., and Wilson, I. A. (2012). 1.8 Structure Validation and Analysis. *Comprehensive Biophysics*, 116–135. doi:10.1016/b978-0-12-374920-8.00110-7
- El-Tarabily, K. A., and Sivasithamparam, K. (2006). Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(7), 1505-1520.
- Emmert, E. A., and Handelsman, J. (1999). Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology letters*, 171(1), 1-9.
- Escrivá, L., Oueslati, S., Font, G., and Manyes, L. (2017). *Alternaria* mycotoxins in food and feed: an overview. *Journal of Food Quality*, 2017.
- Ezeobiora, C. E., Igbokwe, N. H., Amin, D. H., Enwuru, N. V., Okpalanwa, C. F., and Mendie, U. E. (2022). Uncovering the biodiversity and biosynthetic potentials of rare actinomycetes. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 1-19.
- Fages, J. (1994). *Azospirillum inoculants and field experiments* (pp. 87-109). Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Fan, J., Fu, A., and Zhang, L. (2019). Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*, 1-7.
- Farhadi, T. (2018). Advances in protein tertiary structure prediction. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)*, 2(1), 20.
- Ferraz, P., Cássio, F., and Lucas, C. (2019). Potential of yeasts as biocontrol agents of the phytopathogen causing cacao Witches' Broom Disease: is microbial warfare a solution? *Frontiers in microbiology*, 10, 1766.
- Ferreira, L. G., Dos Santos, R. N., Oliva, G., and Andricopulo, A. D. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, 20(7), 13384-13421.
- Ferrier, D. R. (2014). *Biochemistry*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Fichthorn, K. A., and Weinberg, W. H. (1991). Theoretical foundations of dynamical Monte Carlo simulations. *The Journal of chemical physics*, 95(2), 1090-1096.
- Fiser, A. (2010). Template-based protein structure modeling. *Computational biology*, 73-94.
- Fiser, A., and Do, R. K. G. (2000). Modeling of loops in protein structures. *Protein science*, 9(9), 1753-1773.

- Floudas, C. A., Fung, H. K., McAllister, S. R., Mönningmann, M., and Rajgaria, R. (2006). Advances in protein structure prediction and de novo protein design: A review. *Chemical Engineering Science*, 61(3), 966-988.
- Fravel, D., Olivain, C., and Alabouvette, C. (2003). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New phytologist*, 157(3), 493-502.
- Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., and Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(10), 154.
- Fujiwara, T., Oda, K., Yokota, S., Takatsuki, A., and Ikehara, Y. (1988). Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 263(34), 18545-18552.
- Gabaldón, T., Naranjo-Ortiz, M. A., and Marcet-Houben, M. (2016). Evolutionary genomics of yeast pathogens in the Saccharomycotina. *FEMS yeast research*, 16(6), fow064.
- Gadelhak, G. G., El-Tarabily, K. A., and Al-Kaabi, F. K. (2005). Insect control using chitinolytic soil actinomycetes as biocontrol agents. *Int J Agri Biol*, 7(4), 627-633.
- Gai, Y., Liu, B., Ma, H., Li, L., Chen, X., Moenga, S., Riely, B., Fayyaz, A., Wang, M., and Li, H. (2019). The methionine biosynthesis regulator AaMetR contributes to oxidative stress tolerance and virulence in *Alternaria alternata*. *Microbiological research*, 219, 94-109.
- Gallinger, T. L., Aboagye, S. Y., Obermann, W., Weiss, M., Grünweller, A., Unverzagt, C., Williams, D.L., Schlitzer, M., and Haerberlein, S. (2022). First In Silico Screening of Insect Molecules for Identification of Novel Anti-Parasitic Compounds. *Pharmaceuticals*, 15(2), 119.
- Gao, Y., Zeng, X. D., Ren, B., Zeng, J. R., Xu, T., Yang, Y. Z., Hu, X. C., Zhu, Z. Y., Shi, L. M., Zhou, G. Y., Zhou, Q., Liu, X. M., and Zhu, Y. H. (2020). Antagonistic activity against rice blast disease and elicitation of host-defence response capability of an endophytic *Streptomyces albidoflavus* OsiLf-2. *Plant Pathology*, 69(2), 259-271.
- Garg, S., Ram Kumar, D., Yadav, S., Kumar, M., and Yadav, J. (2020). *Alternaria* Blight of Tomato: A Review of Disease and Pathogen Management Approaches. *Acta Scientific Agriculture*, 4(11), 08-15.
- Garganese, F., Schena, L., Siciliano, I., Prigigallo, M. I., Spadaro, D., De Grassi, A., Ippolito, A., and Sanzani, S. M. (2016). Characterization of citrus-associated *Alternaria* species in mediterranean areas. *PLoS One*, 11(9), e0163255.

- Gautam, A. K., and Bhadauria, R. (2012). Characterization of *Aspergillus* species associated with commercially stored triphala powder. *African journal of Biotechnology*, 11(104), 16814-16823.
- Gawai, D. U. (2018). Role of Fungi As Biocontrol Agents for the Control of Plant Diseases in Sustainable Agriculture. In *Fungi and their Role in Sustainable Development: Current Perspectives* (pp. 283-291). Springer, Singapore.
- Geng, C., Nie, X., Tang, Z., Zhang, Y., Lin, J., Sun, M., and Peng, D. (2016). A novel serine protease, Sep1, from *Bacillus firmus* DS-1 has nematocidal activity and degrades multiple intestinal-associated nematode proteins. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
- Gerbore, J. (2013). *Lutte biologique contre un champignon pathogène impliqué dans l'esca de la vigne, par utilisation de l'oomycète Pythium oligandrum* (Doctoral dissertation, Pau).
- Gerlach, W., and Nirenberg, H. (1982). The genus *Fusarium*--a pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem*, (209).
- Gessler, N. N., Aver'yanov, A. A., and Belozerskaya, T. A. (2007). Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochemistry (Moscow)*, 72(10), 1091-1109.
- Gholami, M., Amini, J., Abdollahzadeh, J., and Ashengroph, M. (2019). Basidiomycetes fungi as biocontrol agents against take-all disease of wheat. *Biological Control*, 130, 34-43.
- Ghorri, S. (2015). Isolement des microorganismes possédant une activité anti-*Fusarium*. Thèse de doctorat. Université de Constantine.
- Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N., and Wendoloski, J. J. (1999). A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *Journal of combinatorial chemistry*, 1(1), 55-68.
- Ghosh, S. K., Banerjee, S., and Sengupta, C. (2017). Bioassay, characterization and estimation of siderophores from some important antagonistic Fungi. *Journal of Biopesticides*, 10(2), 105-112.

- Girvan, M. S., Bullimore, J., Pretty, J. N., Osborn, A. M., and Ball, A. S. (2003). Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied and environmental microbiology*, 69(3), 1800-1809.
- Glick BR, Cheng Z, Czarny J and Duan J (2007) Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol* 119:329-39.
- Gohlke, H. and Klebe, G. (2002). Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angewandte Chemie (International Edition in English)*, 41 : 2644–2676.
- González-Franco, A. C., and Robles-Hernández, L. (2009). Actinomycetes as biological control agents of phytopathogenic fungi. *Tecnociencia Chihuahua*, 3(2), 64-73.
- Govindaraji, P. K., and Vuppu, S. (2020). Characterisation of pectin and optimization of pectinase enzyme from novel *Streptomyces fumigatiscleroticus* VIT-SP4 for drug delivery and concrete crack-healing applications: An eco-friendly approach. *Saudi journal of biological sciences*, 27(12), 3529-3540.
- Gozzo, F. (2003). Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4487-4503.
- Guan, B., Zhang, C., and Ning, J. (2016). EDGA: a population evolution direction-guided genetic algorithm for protein–ligand docking. *Journal of Computational Biology*, 23(7), 585-596.
- Guan, B., Zhang, C., and Ning, J. (2017). Genetic algorithm with a crossover elitist preservation mechanism for protein–ligand docking. *Amb Express*, 7(1), 1-11.
- Guarro, J., Gené, J., and Stchigel, A. M. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clinical microbiology reviews*, 12(3), 454-500.
- Guedes, I. A., Pereira, F. S., and Dardenne, L. E. (2018). Empirical scoring functions for structure-based virtual screening: applications, critical aspects, and challenges. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1089.
- Guerriero, G., Hausman, J. F., Strauss, J., Ertan, H., and Siddiqui, K. S. (2015). Destructuring plant biomass: focus on fungal and extremophilic cell wall hydrolases. *Plant Science*, 234, 180-193.

- Guo, W., Li, Z., Yuan, M., Chen, G., Li, Q., Xu, H., and Yang, X. (2020). Molecular insight into stereoselective ADME characteristics of C20-24 epimeric epoxides of protopanaxadiol by docking analysis. *Biomolecules*, 10(1), 112.
- Guo, Y. (2020). Modifying bacterial symbionts for biocontrol. *Nature Food*, 1(3), 151-151.
- Gupta, R., Saxena, R. K., Chaturvedi, P., and Viridi, J. S. (1995). Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(4), 378-383.
- Hageskal, G., Lima, N., and Skaar, I. (2009). The study of fungi in drinking water. *Mycological research*, 113(2), 165-172.
- Haggag, W. M., and Mohamed, H. A. A. (2007). Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 1(1), 7-12.
- Hameduh, T., Haddad, Y., Adam, V., and Heger, Z. (2020). Homology modeling in the time of collective and artificial intelligence. *Computational and structural biotechnology journal*, 18, 3494.
- Hamid, R., Khan, M. A., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Abdin, M. Z., Musarrat, J., and Javed, S. (2013). Chitinases: an update. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 5(1), 21.
- Hammami, I., Hsouna, A. B., Hamdi, N., Gdoura, R., and Triki, M. A. (2013). Isolation and characterization of rhizospherebacteria for the biocontrol of the damping-off disease of tomatoes in Tunisia. *Comptes rendus biologiques*, 336(11-12), 557-564.
- Han, B., and Weiss, L. M. (2017). Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. *Microbiology spectrum*, 5(2), 5-2.
- Han, Y., Zhang, J., Hu, C. Q., Zhang, X., Ma, B., and Zhang, P. (2019). In silico ADME and toxicity prediction of ceftazidime and its impurities. *Frontiers in pharmacology*, 10, 434.
- Hao, F., Ding, T., Wu, M., and Zhang, J. (2018). Two novel hypovirulence-associated mycoviruses in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*: molecular characterization and suppression of infection cushion formation. *Viruses* 10 :254. Doi : 10.3390/v10050254.
- Hao, Q., Deng, J., Yang, F., Wang, G., Xiao, Y., and Xiao, X. (2020). Biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea* with the entomopathogenic fungus *Metarhiziumanisopliae*. *Pathogens*, 9(3), 213.

- Hasan, R., Rony, M. N. H., and Ahmed, R. (2021). In silico characterization and structural modeling of bacterial metalloprotease of family M4. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 1-20.
- Hassouna, M. G., El-Saedy, M. A. M., and Saleh, H. M. (1998). Biocontrol of soil-borne plant pathogens attacking cucumber (*Cucumis sativus*) by Rhizobacteria in a semiarid environment. *Arid Land Research and Management*, 12(4), 345-357.
- Hatmal, M. M. M., and Taha, M. O. (2017). Simulated annealing molecular dynamics and ligand–receptor contacts analysis for pharmacophore modeling. *Future medicinal chemistry*, 9(11), 1141-1159.
- Havel, T. F. (1998). Distance geometry: Theory, algorithms, and chemical applications. *Encyclopedia of Computational Chemistry*, 120, 723-742.
- Hazarika, S. N., and Thakur, D. (2020). Actinobacteria. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 443-476). Academic Press.
- He, D. C., He, M. H., Amalin, D. M., Liu, W., Alvindia, D. G., and Zhan, J. (2021). Biological control of plant diseases: An evolutionary and eco-economic consideration. *Pathogens*, 10(10), 1311.
- He, L., Cheng, H., Zhao, L., Htun, A. A., Yu, Z. H., Deng, J. X., and Li, Q. L. (2021). Morphological and molecular identification of two new *Alternaria* species (Ascomycota, Pleosporaceae) in section *Radicina* from China. *MycKeys*, 78, 187.
- Hedley, P. L., Jørgensen, P., Schlamowitz, S., Wangari, R., Moolman-Smook, J., Brink, P. A., Kanters, J. K., Corfield, V. A., and Christiansen, M. (2009). The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update. *Human mutation*, 30(11), 1486-1511.
- Hell, R., and Wirtz, M. (2011). Molecular biology, biochemistry and cellular physiology of cysteine metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 9.
- Hernández-Santoyo, A., Tenorio-Barajas, A. Y., Altuzar, V., Vivanco-Cid, H., and Mendoza-Barrera, C. (2013). Protein-protein and protein-ligand docking. *Protein engineering-technology and application*, 63-81.
- Heydari, A., and Pessarakli, M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of biological sciences*, 10(4), 273-290.

- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Kirk, R., Lumbsch, H.T., Lutzoni, F., Matheny, P.B., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, A.J., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauero, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dair, Y.C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Guédang, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosokawa, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Irons, J.E., Ljalko, U.K., Kurtzman, C.P., Larsson, K., Lichtwardt, R., Longcore, J., Dlikowski, J.M., Miller, A., Moncalvo, J., MOZLEY-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Samadpour, J.P., Silar, A., Sugiyama, J., Thoma, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winkler, K., Yao, Y., and Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509-547.
- Hollingsworth, S. A., and Dror, R. O. (2018). Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*, 99(6), 1129-1143.
- Hooda, V., Babu Gundala, P., and Chinthala, P. (2012). Sequence analysis and homology modeling of peroxidase from *Medicago sativa*. *Bioinformation*, 8(20), 974.
- Hoque, M. T., Chetty, M., and Sattar, A. (2009). Genetic algorithm in ab initio protein structure prediction using low resolution model: A review. *Biomedical data and applications*, 317-342.
- Hovmöller, S., Zhou, T., and Ohlson, T. (2002). Conformations of amino acids in proteins. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 58(Pt 5), 768–776. <https://doi.org/10.1107/s0907444902003359>
- Huang, H. C., and Erickson, R. S. (2007). Effect of seed treatment with *Rhizobium leguminosarum* on *Pythium damping-off*, seedling height, root nodulation, root biomass, shoot biomass, and seed yield of pea and lentil. *Journal of Phytopathology*, 155(1), 31-37.
- Huang, Q., Liu, H., Zhang, J., Wang, S., Liu, F., Li, C., and Wang, G. (2022). Production of extracellular amylase contributes to the colonization of *Bacillus cereus* 0-9 in wheat roots.
- Huang, S. Y., and Zou, X. (2010). Advances and challenges in protein-ligand docking. *International journal of molecular sciences*, 11(8), 3016-3034.

- Huang, S. Y., Grinter, S. Z., and Zou, X. (2010). Scoring functions and their evaluation methods for protein–ligand docking: recent advances and future directions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(40), 12899-12908.
- Hubballi, M., Sornakili, A., Nakkeeran, S., Anand, T., and Raguchander, T. (2011). Virulence of *Alternaria alternata* infecting noni associated with production of cell wall degrading enzymes. *Journal of Plant Protection Research*.
- Imran, M., Anwar, Z., Irshad, M., Asad, M. J., and Ashfaq, H. (2016). Cellulase production from species of fungi and bacteria from agricultural wastes and its utilization in industry: a review. *Advances in Enzyme Research*, 4(2), 44-55.
- Inbathamizh, L., and Padmini, E. (2013). Quinic acid as a potent drug candidate for prostate cancer—a comparative pharmacokinetic approach. *Asian J Pharm Clin Res*, 6(4), 106-112.
- Iqbal, H. M., Kyazze, G., Tron, T., and Keshavarz, T. (2018). Laccase from *Aspergillus niger*: A novel tool to graft multifunctional materials of interests and their characterization. *Saudi journal of biological sciences*, 25(3), 545-550.
- Janaki, T. (2017). Enzymes from actinomycetes—review. *International Journal of ChemTech Research*, 10(2), 176-182.
- Jaroszuk-Ściseł, J., Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., Majewska, M., Hanaka, A., Tiskiewicz, K., Pawlik, A., and Janusz, G. (2019). Phytohormones (auxin, gibberellin) and ACC deaminase in vitro synthesized by the mycoparasitic *Trichoderma DEMTkZ3A0* strain and changes in the level of auxin and plant resistance markers in wheat seedlings inoculated with this strain conidia. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4923.
- Ji, Z. L., Peng, S., Chen, L. L., Liu, Y., Yan, C., and Zhu, F. (2020). Identification and characterization of a serine protease from *Bacillus licheniformis* W10: A potential antifungal agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 594-603.
- Jinal, H. N., and Amaresan, N. (2020). Characterization of medicinal plant-associated biocontrol *Bacillus subtilis* (SSL2) by liquid chromatography-mass spectrometry and evaluation of compounds by in silico and in vitro methods. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38(2), 500-510.
- Jing, X., and Dong, Q. (2017). MQAPRank: improved global protein model quality assessment by learning-to-rank. *BMC bioinformatics*, 18(1), 1-8.

- Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G., and Im, W. (2008). CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of computational chemistry*, 29(11), 1859-1865.
- John, B., and Sali, A. (2003). Comparative protein structure modeling by iterative alignment, model building and model assessment. *Nucleic acids research*, 31(14), 3982-3992.
- Joo, K., Lee, J., and Lee, J. (2011). Methods for accurate homology modeling by global optimization. In *Homology Modeling* (pp. 175-188). Humana Press.
- Joubert, P. M., and Doty, S. L. (2018). Endophytic yeasts: Biology, ecology and applications. In *Endophytes of forest trees* (pp. 3-14). Springer, Cham.
- Jung, S. J., Kim, N. K., Lee, D. H., Hong, S. I., and Lee, J. K. (2018). Screening and evaluation of *Streptomyces* species as a potential biocontrol agent against a wood decay fungus, *Gloeophyllum trabeum*. *Mycobiology*, 46(2), 138-146.
- Jyoti, S., and Singh, D. (2016). Fungi as biocontrol agents in sustainable agriculture. Microbes and Environmental Management. *Studium Press, India*, 172-194.
- Kanazawa, S., Asakawa, S., and Takai, Y. (1988). Effect of fertilizer and manure application on microbial numbers, biomass, and enzyme activities in volcanic ash soils: I. Microbial numbers and biomass carbon. *Soil Science and Plant Nutrition*, 34(3), 429-439.
- Kanimozhi, S., and Perinbam, K. (2015). Optimization of media components and growth conditions to enhance lipase production by *Pseudomonas* sp. Lp1. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 3(2), 329-338.
- Kanjanamaneesathian, M., and Meetum, P. (2019). Comparison of aqueous seasoning cube solution and nutrient broth as culture media for production of the biocontrol agent *Bacillus megaterium* in the laboratory, and for suppression of rice grain discolouration in the field. *New Zealand Plant Protection*, 72, 205-212.
- Karplus, M., and McCammon, J. A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature structural biology*, 9(9), 646-652.
- Kasam, V. (2009). *In silico* drug discovery on computational Grids for finding novel drugs against neglected diseases. PhD Thesis. University of Bonn, Germany.
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., and Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current microbiology*, 57(5), 503-507.

- Kawamura, C., Tsujimoto, T., and Tsuge, T. (1999). Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular plant-microbe interactions*, 12(1), 59-63.
- Kenton, W. (2019). Monte Carlo Simulation. *Investopedia*. June, 10. [Monte Carlo Simulation Definition \(investopedia.com\)](https://www.investopedia.com/terms/m/monte-carlo-simulation-definition/)
- Khadayat, K., Sherpa, D. D., Malla, K. P., Shrestha, S., Rana, N., Marasini, B. P., Khanal, S., Rayamajhee, B., Bhattarai, B.R., and Parajuli, N. (2020). Molecular identification and antimicrobial potential of *Streptomyces* species from Nepalese soil. *International journal of microbiology*, 2020.
- Khan, A. H., and Karuppayil, S. M. (2012). Fungal pollution of indoor environments and its management. *Saudi journal of biological sciences*, 19(4), 405-426.
- Khan, J. A., and Yadav, S. K. (2011). Production of alpha amylases by *Aspergillus niger* using cheaper substrates employing solid state fermentation. *Int. J. Plant Animal Environ. Sci.* 1, 100–108.
- Khasa, Y. P. (2017). Microbes as biocontrol agents. In *Probiotics and Plant Health* (pp. 507-552). Springer, Singapore.
- Khatri, B. P., Bhattarai, T., Shrestha, S., and Maharjan, J. (2015). Alkaline thermostable pectinase enzyme from *Aspergillus niger* strain MCAS2 isolated from Manaslu Conservation Area, Gorkha, Nepal. *SpringerPlus*, 4(1), 1-8.
- Kim, V. Y., Batty, A., Li, J., Kirk, S. G., Crowell, S. A., Jin, Y., Tang, J., Zhang, J., Rogers, L.K., Deng, H., Nelin, L.D., and Liu, Y. (2019). Glutathione reductase promotes fungal clearance and suppresses inflammation during systemic *Candida albicans* infection in mice. *The Journal of Immunology*, 203(8), 2239-2251.
- Kim, Y. S., Umurzokov, M., Cho, K. M., Choi, J. S., and Park, K. W. (2022). Insecticidal characteristics and structural identification of the potential active compounds from *Streptomyces* sp. KR0006: Strain improvement through mutagenesis. *PloS one*, 17(9), e0274766.
- Kimura, N. O. R. I. O., and Tsuge, T. A. K. A. S. H. I. (1993). Gene cluster involved in melanin biosynthesis of the filamentous fungus *Alternaria alternata*. *Journal of Bacteriology*, 175(14), 4427-4435.
- King, J. E., and Koes, D. R. (2020). SidechainNet: An All-Atom Protein Structure Dataset for Machine Learning. *arXiv preprint arXiv:2010.08162*.

- Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., and Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews Drug discovery*, 3(11), 935-949.
- Kleywegt, G. J. (2000). Validation of protein crystal structures. *Acta Crystallographica Section D : Biological Crystallography*, 56(3), 249-265.
- Köhl, J., Kolnaar, R., and Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in plant science*, 10, 845.
- Koley, S., and Mahapatra, S. S. (2015). Evaluation of culture media for growth characteristics of *Alternaria solani*, causing early blight of tomato. *J. Plant Path. Microbiol. S, 1*.
- Kopp, J., and Schwede, T. (2004). Automated protein structure homology modeling: a progress report. *Pharmacogenomics*, 5(4), 405-416.
- Kovačević, S. Z., Jevrić, L. R., Kuzmanović, S. O. P., and Lončar, E. S. (2014). Prediction of in-silico ADME properties of 1, 2-O-isopropylidene aldohexose derivatives. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 13(3), 899.
- Krain, A., and Siupka, P. (2021). Fungal Guttation, a Source of Bioactive Compounds, and Its Ecological Role-A Review. *Biomolecules*, 11(9), 1270.
- Krumrine, J., Raubacher, F., Brooijmans, N., and Kuntz, I. (2003). Principles and methods of docking and ligand design. *Methods of biochemical analysis*, 44, 443-476.
- Kshetri, L., Naseem, F., and Pandey, P. (2019). Role of *Serratia* sp. as Biocontrol Agent and Plant Growth Stimulator, with Prospects of Biotic Stress Management in Plant. In *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management* (pp. 169-200). Springer, Singapore.
- Kubicek, C. P., Starr, T. L., and Glass, N. L. (2014). Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual review of phytopathology*, 52, 427-451.
- Kufareva, I., and Abagyan, R. (2011). Methods of protein structure comparison. In *Homology Modeling* (pp. 231-257). Humana Press.
- Kumar, D. S., and Ray, S. (2014). Fungal lipase production by solid state fermentation-an overview. *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques*, 6(230), 1-10.

- Kumar, R., Kaur, J., Jain, S., and Kumar, A. (2016). Optimization of laccase production from *Aspergillus flavus* by design of experiment technique: Partial purification and characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1), 125-131.
- Kuplińska, A., and Rząd, K. (2021). Molecular targets for antifungals in amino acid and protein biosynthetic pathways. *Amino acids*, 1-31.
- Kustrzeba-Wójcicka, I., Siwak, E., Terlecki, G., Wolańczyk-Mędrała, A., and Mędrała, W. (2014). *Alternaria alternata* and its allergens: a comprehensive review. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 47(3), 354-365.
- Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmael, Q., El Hamss, H., Belabess, Z., and Barka, E. A. (2022). Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. *Microorganisms*, 10(3), 596.
- Lahuf, A. A., Kareem, A. A., Al-Sweedi, T. M., and Alfarttoosi, H. A. (2019, October). Evaluation the potential of indigenous biocontrol agent *Trichoderma harzianum* and its interactive effect with nanosized ZnO particles against the sunflower damping-off pathogen, *Rhizoctonia solani*. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 365, No. 1, p. 012033). IOP Publishing.
- Lam, S. D., Das, S., Sillitoe, I., and Orengo, C. (2017). An overview of comparative modelling and resources dedicated to large-scale modelling of genome sequences. *Acta Crystallographica Section D : Structural Biology*, 73(8), 628-640.
- Lameijer, E. W., Bäck, T., Kok, J. N., and Ijzerman, A. P. (2005). Evolutionary algorithms in drug design. *Natural Computing*, 4(3), 177-243.
- Lara-Márquez, A., Zavala-Páramo, M. G., López-Romero, E., Calderón-Cortés, N., López-Gómez, R., Conejo-Saucedo, U., and Cano-Camacho, H. (2011). Cloning and characterization of a pectin lyase gene from *Colletotrichum lindemuthianum* and comparative phylogenetic/structural analyses with genes from phytopathogenic and saprophytic/opportunistic microorganisms. *BMC microbiology*, 11(1), 1-15.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography*, 26(2), 283-291.
- Law, J. W. F., Ser, H. L., Khan, T. M., Chuah, L. H., Pusparajah, P., Chan, K. G., Goh, B.H., and Lee, L. H. (2017). The potential of *Streptomyces* as biocontrol agents against the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*). *Frontiers in microbiology*, 8, 3.

- Lawrence, D. P., Rotondo, F., and Gannibal, P. B. (2016). Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. *Mycological Progress*, 15(1), 1-22.
- Lee, H. J., and Park, O. K. (2019). Lipases associated with plant defense against pathogens. *Plant Science*, 279, 51-58.
- Lee, J., Freddolino, P. L., and Zhang, Y. (2017). Ab initio protein structure prediction. In *From protein structure to function with bioinformatics* (pp. 3-35). Springer, Dordrecht.
- Lee, J., Lee, D., Park, H., Coutsias, E. A., and Seok, C. (2010). Protein loop modeling by using fragment assembly and analytical loop closure. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(16), 3428-3436.
- Lee, J., Lee, J., Sasaki, T. N., Sasai, M., Seok, C., and Lee, J. (2011). De novo protein structure prediction by dynamic fragment assembly and conformational space annealing. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 79(8), 2403-2417.
- Lei, T., Chen, F., Liu, H., Sun, H., Kang, Y., Li, D., Li, Y., and Hou, T. (2017). ADMET evaluation in drug discovery. Part 17: development of quantitative and qualitative prediction models for chemical-induced respiratory toxicity. *Molecular pharmaceutics*, 14(7), 2407-2421.
- Lejon, S., Ellis, J., and Vålgård, K. (2008). The last step in cephalosporin C formation revealed: crystal structures of deacetylcephalosporin C acetyltransferase from *Acremonium chrysogenum* in complexes with reaction intermediates. *Journal of molecular biology*, 377(3), 935-944.
- Lengauer, T., and Rarey, M. (1996). Computational methods for biomolecular docking. *Current opinion in structural biology*, 6(3), 402-406.
- Li, H., Sze, K. H., Lu, G., and Ballester, P. J. (2020). Machine-learning scoring functions for structure-based drug lead optimization. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 10(5), e1465.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., and Jiang, C. (2016). Morphological identification of actinobacteria. *Actinobacteria-basics and biotechnological applications*, 59-86.
- Li, S., Yang, B., Tan, G. Y., Ouyang, L. M., Qiu, S., Wang, W., Xiang, W., and Zhang, L. (2021). Polyketide pesticides from actinomycetes. *Current Opinion in Biotechnology*, 69, 299-307.
- Li, W., Long, Y., Mo, F., Shu, R., Yin, X., Wu, X., Zhang, R., Zhang, Z., He, L., Chen, T., and Chen, J. (2021). Antifungal Activity and Biocontrol Mechanism of *Fusicolla violacea* J-1 against Soft Rot in Kiwifruit Caused by *Alternaria alternata*. *Journal of Fungi*, 7(11), 937.

- Li, X., Du, Z., Wang, J., Wu, Z., Li, W., Liu, G., Shen, X., and Tang, Y. (2015). In silico estimation of chemical carcinogenicity with binary and ternary classification methods. *Molecular Informatics*, 34(4), 228-235.
- Li, Y., Feng, X., Wang, X., Zheng, L., and Liu, H. (2020). Inhibitory effects of *Bacillus licheniformis* BL06 on *Phytophthora capsici* in pepper by multiple modes of action. *Biological Control*, 104210.
- Li, Z. T., Janisiewicz, W. J., Liu, Z., Callahan, A. M., Evans, B. E., Jurick, W. M., and Dardick, C. (2019). Exposure in vitro to an Environmentally Isolated Strain TC09 of *Cladosporium sphaerospermum* Triggers Plant Growth Promotion, Early Flowering, and Fruit Yield Increase. *Frontiers in plant science*, 9, 1959.
- Li, Z., Guo, B., Wan, K., Cong, M., Huang, H., and Ge, Y. (2015). Effects of bacteria-free filtrate from *Bacillus megaterium* strain L2 on the mycelium growth and spore germination of *Alternaria alternata*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(6), 1062-1068.
- Liao, D. I., Basarab, G. S., Gatenby, A. A., Valent, B., and Jordan, D. B. (2001). Structures of trihydroxynaphthalene reductase-fungicide complexes: implications for structure-based design and catalysis. *Structure*, 9(1), 19-27.
- Lim, W., Konings, M., Parel, F., Eadie, K., Strepis, N., Fahal, A., Verbon, A., and van de Sande, W. W. (2022). Inhibiting DHN-and DOPA-melanin biosynthesis pathway increased the therapeutic value of itraconazole in *Madurella mycetomatis* infected *Galleria mellonella*. *Medical Mycology*, 60(2), myac003.
- Liu, Y., Xu, H., Yan, Q., Yang, S., Duan, X., and Jiang, Z. (2013). Biochemical characterization of a first fungal esterase from *Rhizomucor miehei* showing high efficiency of ester synthesis. *PLoS One*, 8(10), e77856.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2000). Hierarchical structure of proteins. In *Molecular Cell Biology*. 4th edition. WH Freeman.
- Long, S. R. (1996). Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective. *The Plant Cell*, 8(10), 1885.
- Lopez, S. E., and Cabral, D. (1999). *Alternaria*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 42–49. doi:10.1006/rwfm.1999.0045

- Loureiro, D. R., Soares, J. X., Costa, J. C., Magalhães, Á. F., Azevedo, C. M., Pinto, M. M., and Afonso, C. M. (2019). Structures, activities and drug-likeness of anti-infective xanthone derivatives isolated from the marine environment: a review. *Molecules*, 24(2), 243.
- Lugtenberg, B., and Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, 63, 541-556.
- Luna, E. D. P. I. (2017). Endophytic Yeast and Hosts: A Mutualistic Association Friendly to the Environment. *Old Yeasts-New Questions*, 169-188.
- Lundqvist, T., Rice, J., Hodge, C. N., Basarab, G. S., Pierce, J., and Lindqvist, Y. (1994). Crystal structure of scytalone dehydratase—a disease determinant of the rice pathogen, *Magnaporthe grisea*. *Structure*, 2(10), 937-944.
- Lunge, A. G., and Patil, A. S. (2012). Characterization of efficient chitinolytic enzyme producing *Trichoderma* species: a tool for better antagonistic approach. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 1(5), 377-385.
- Lyu, X., Shen, C., Fu, Y., Xie, J., Jiang, D., Li, G., and Cheng, J. (2015). Comparative genomic and transcriptional analyses of the carbohydrate-active enzymes and secretomes of phytopathogenic fungi reveal their significant roles during infection and development. *Scientific reports*, 5(1), 1-16.
- Ma, H., Wang, M., Gai, Y., Fu, H., Zhang, B., Ruan, R., Chung, K.R., and Li, H. (2018). Thioredoxin and glutaredoxin systems required for oxidative stress resistance, fungicide sensitivity, and virulence of *Alternaria alternata*. *Applied and environmental microbiology*, 84(14), e00086-18.
- Ma, Y., Chang, Z. Z., Zhao, J. T., and Zhou, M. G. (2008). Antifungal activity of *Penicillium striatisporum* Pst10 and its biocontrol effect on Phytophthora root rot of chilli pepper. *Biological Control*, 44(1), 24-31.
- Mackay, D., Celsie, A. K., Powell, D. E., and Parnis, J. M. (2018). Bioconcentration, bioaccumulation, biomagnification and trophic magnification : a modelling perspective. *Environmental Science : Processes & Impacts*, 20(1), 72-85.
- Madsen, A. M. (2011). Occupational exposure to microorganisms used as biocontrol agents in plant production. *Front Biosci (Schol Ed)*, 3, 606-620.
- Mahajan, G. B., and Balachandran, L. (2012). Antibacterial agents from actinomycetes-a review. *Frontiers in Bioscience-Elite*, 4(1), 240-253.

- Malathi, K., and Ramaiah, S. (2018). Bioinformatics approaches for new drug discovery: a review. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 34(2), 243-260.
- Malik, A., Manan, A., and Mirza, M. U. (2017). Molecular docking and in silico ADMET studies of silibinin and glycyrrhetic acid anti-inflammatory activity. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(1), 67-74.
- Malviya, M. K., Pandey, A., Sharma, A., and Tiwari, S. C. (2013). Characterization and identification of actinomycetes isolated from 'fired plots' under shifting cultivation in northeast Himalaya, India. *Annals of microbiology*, 63(2), 561-569.
- Mamgain, A., Roychowdhury, R., and Tah, J. (2013). *Alternaria* pathogenicity and its strategic controls. *Research Journal of Biology*, 1, 1-9.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., and Kim, S. K. (2013). Introduction to marine *Actinobacteria*. *Marine Microbiology*, 1-19.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Senthilkumar, K., Sivakumar, K., and Kim, S. K. (2013). Biosynthesis, antimicrobial and cytotoxic effect of silver nanoparticles using a novel *Nocardiopsis* sp. MBRC-1. *BioMed research international*, 2013.
- Marschner, P., Yang, C. H., Lieberei, R., and Crowley, D. E. (2001). Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil biology and biochemistry*, 33(11), 1437-1445.
- Marshall, A. C., Kidd, S. E., Lamont-Friedrich, S. J., Arentz, G., Hoffmann, P., Coad, B. R., and Bruning, J. B. (2019). *Aspergillus fumigatus* thioredoxin reductase: structure, mechanism, and inhibition. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- Martínez, L. (2015). Automatic identification of mobile and rigid substructures in molecular dynamics simulations and fractional structural fluctuation analysis. *PloS one*, 10(3), e0119264.
- Matthyse, A. G., Marry, M., Krall, L., Kaye, M., Ramey, B. E., Fuqua, C., and White, A. R. (2005). The effect of cellulose overproduction on binding and biofilm formation on roots by *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular plant-microbe interactions*, 18(9), 1002-1010.
- McConnaughey, M. (2014). Physical Chemical Properties of Fungi. *Reference Module in Biomedical Sciences*. Doi :10.1016/b978-0-12-801238-3.05231-4
- McGinnis, M. R., and Tyring, S. K. (1996). Introduction to mycology. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston
- McNeely, D., Chanyi, R. M., Dooley, J. S., Moore, J. E., and Koval, S. F. (2017).

Biocontrol of Burkholderia cepacia complex bacteria and bacterial phytopathogens by Bdellovibrio bacteriovorus. *Can. J. Microbiol.* 63, 350–358. doi: 10.1139/cjm-2016-0612.

- Meena, M., Gupta, S. K., Swapnil, P., Zehra, A., Dubey, M. K., and Upadhyay, R. S. (2017). *Alternaria* toxins: potential virulence factors and genes related to pathogenesis. *Frontiers in microbiology*, 8, 1451.
- Meena, M., Swapnil, P., Zehra, A., Aamir, M., Dubey, M. K., Patel, C. B., and Upadhyay, R. S. (2019). Virulence factors and their associated genes in microbes. In *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* (pp. 181-208). Elsevier.
- Meena, M., Zehra, A., Dubey, M. K., Aamir, M., Gupta, V. K., and Upadhyay, R. S. (2016). Comparative evaluation of biochemical changes in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) infected by *Alternaria alternata* and its toxic metabolites (TeA, AOH, and AME). *Frontiers in plant science*, 7, 1408.
- Mehnaz, D., Abdulla, K., Aiysha, D., Zaheer, A., and Mukhtar, S. (2017). Actinomycetes: a source of industrially important enzymes.
- Mehnaz, S. (2015). Azospirillum: a biofertilizer for every crop. In *Plant microbes symbiosis: Applied facets* (pp. 297-314). Springer, New Delhi.
- Melin, P., Sundh, I., Håkansson, S., and Schnürer, J. (2007). Biological preservation of plant derived animal feed with antifungal microorganisms: safety and formulation aspects. *Biotechnology letters*, 29(8), 1147-1154.
- Melomey, L. D., Danquah, A., Offei, S. K., Ofori, K., Danquah, E., and Osei, M. (2019). Review on tomato (*Solanum lycopersicum*, L.) improvement programmes in Ghana. *Recent advances in tomato breeding and production*, 49.
- Mendoza, A. R., Kiewnick, S., and Sikora, R. A. (2008). In vitro activity of *Bacillus firmus* against the burrowing nematode *Radopholus similis*, the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*. *Biocontrol Science and Technology*, 18(4), 377-389.
- Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., and Cui, M. (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*, 7(2), 146-157.

- Meronuck, R. A., Steele, J. A., Mirocha, C. J., and Christensen, C. M. (1972). Tenuazonic acid, a toxin produced by *Alternaria alternata*. *Applied microbiology*, 23(3), 613-617.
- Migahed, F. F. (2003). Distribution of fungi in the sandy soil of Egyptian beaches. *Mycobiology*, 31(2), 61-67.
- Millan, A. F. S., Larraya, L., Farran, I., Ancin, M., and Veramendi, J. (2021). Successful biocontrol of major postharvest and soil-borne plant pathogenic fungi by antagonistic yeasts. *Biological Control*, 160, 104683.
- Minuto, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., and Gullino, M. L. (2006). Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. *Crop Protection*, 25(5), 468-475.
- Mishra, K. (2019). Exploring Selenium Hydrogen Bonding through Gas Phase Spectroscopy Coupled with Quantum Chemical Calculations (Doctoral dissertation).
- Mishra, S. (2013). Fundamentals of Homology Modeling Steps and Comparison among Important Bioinformatics Tools: An Overview Akansha Saxena Halberg Hospital and Research Center, Civil Lines, Moradabad 244 001, UP, India Rajender Singh Sangwan Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Near Kukrail Picnic Spot, PO CIMAP, Lucknow 226 015, UP, India. *Science International*, 1(7).
- Missall, T. A., and Lodge, J. K. (2005). Thioredoxin reductase is essential for viability in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 4(2), 487-489.
- Moitessier, N., Englebienne, P., Lee, D., Lawandi, J. and Corbeil, C. (2008). Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. *British Journal of Pharmacology*, 153: S7–S26.
- Mojgani, N. (2017). Bacteriocin-Producing Rhizosphere Bacteria and Their Potential as a Biocontrol Agent. In *Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation* (pp. 165-181). Springer, Singapore.
- Money, N. P. (2016). Fungal Diversity. *The Fungi*, 1–36. Doi :10.1016/b978-0-12-382034-1.00001-3
- Moore, D., Alexopoulos, C.J and Ahmadjian, V. (2020). *fungus*. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/fungus>

- Morris, G. M., and Lim-Wilby, M. (2008). *Molecular Docking. Molecular Modeling of Proteins*, 365–382. doi:10.1007/978-1-59745-177-2_19
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., and Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of computational chemistry*, 19(14), 1639-1662.
- Morrow, C. A., and Fraser, J. A. (2009). Sexual reproduction and dimorphism in the pathogenic basidiomycetes. *FEMS yeast research*, 9(2), 161-177.
- Mousavi, S. S., Karami, A., Haghghi, T. M., Tumilaar, S. G., Idroes, R., Mahmud, S., Celik, I., Agagunduz, D., Tallei, T.E., Emran, T.B., and Capasso, R. (2021). In Silico Evaluation of Iranian Medicinal Plant Phytoconstituents as Inhibitors against Main Protease and the Receptor-Binding Domain of SARS-CoV-2. *Molecules*, 26(18), 5724.
- Muegge, I., Heald, S. L., and Brittelli, D. (2001). Simple selection criteria for drug-like chemical matter. *Journal of medicinal chemistry*, 44(12), 1841-1846.
- Mugao, L. G., Muturi, P. W., Gichimu, B. M., and Njoroge, E. K. (2020). In vitro control of *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani* using crude extracts and essential oils from selected plants. *International Journal of Agronomy*, 2020.
- Muhammed, M. T., and Aki-Yalcin, E. (2019). Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. *Chemical biology & drug design*, 93(1), 12-20.
- Muhammed, M. T., Son, Ç. D., and İzgü, F. (2019). Three-dimensional structure prediction of panomycocin, a novel Exo- β -1, 3-glucanase isolated from *Wickerhamomyces anomalus* NCYC 434 and the computational site-directed mutagenesis studies to enhance its thermal stability for therapeutic applications. *Computational Biology and Chemistry*, 80, 270-277.
- Muiru, W. M., Mutitu, E. W., and Mukunya, D. M. (2008). Identification of selected actinomycete isolates and characterization of their antibiotic metabolites.
- Mukerji, K. G. (2000). Exploitation of protoplast fusion technology in improving biocontrol potential. In *Biocontrol potential and its exploitation in sustainable agriculture* (pp. 39-48). Springer, Boston, MA.
- Munimbazi, C., and Bullerman, L. B. (1998). Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 959–968.

- Nagpure, A., Choudhary, B., and Gupta, R. K. (2014). Chitinases: in agriculture and human healthcare. *Critical reviews in biotechnology*, 34(3), 215-232.
- Nakasako, M., Motoyama, T., Kurahashi, Y., and Yamaguchi, I. (1998). Cryogenic X-ray crystal structure analysis for the complex of scytalone dehydratase of a rice blast fungus and its tight-binding inhibitor, carpropamid: the structural basis of tight-binding inhibition. *Biochemistry*, 37(28), 9931-9939.
- Naqvi, A. A., Mohammad, T., Hasan, G. M., and Hassan, M. (2018). Advancements in docking and molecular dynamics simulations towards ligand-receptor interactions and structure-function relationships. *Current topics in medicinal chemistry*, 18(20), 1755-1768.
- Naranjo-Ortiz, M. A., and Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: Diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, 94(6), 2101-2137.
- Nayak, S. K., Nayak, S., Mohanty, S., Sundaray, J. K., and Mishra, B. B. (2021). Microbial Chitinases and Their Applications: An Overview. *Environmental and Agricultural Microbiology: Applications for Sustainability*, 313-340.
- Nayyar, B. G., Akhund, S., and Akram, A. (2014). A review: management of *Alternaria* and its mycotoxins in crops. *International Journal of Advanced and Applied Sciences*, 3(4), 432-437.
- Negi, A., Bhushan, S., Gupta, P., Garg, P., and Kumar, R. (2013). Cystathionine β -lyase-like protein with pyridoxal binding domain characterized in leishmania major by comparative sequence analysis and homology modelling. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
- Newitt, J. T., Prudence, S. M., Hutchings, M. I., and Worsley, S. F. (2019). Biocontrol of cereal crop diseases using streptomycetes. *Pathogens*, 8(2), 78.
- Ngo, M., Van Nguyen, M., Han, J., Kim, B., Kim, Y., Park, M., Kim, H., and Choi, G. (2021). Biocontrol Potential of *Aspergillus* Species Producing Antimicrobial Metabolites. *Frontiers in microbiology*, 12.
- Nic, M., Jirat, J., Kosata, B., Jenkins, A., and McNaught, A. (2012). IUPAC compendium of chemical terminology (gold book), online version.
- Niture, S. K., Kumar, A. R., Parab, P. B., and Pant, A. (2008). Inactivation of polygalacturonase and pectate lyase produced by pH tolerant fungus *Fusarium moniliforme* NCIM 1276 in a liquid medium and in the host tissue. *Microbiological research*, 163(1), 51-62.

- Ntie-Kang, F. (2013). An in-silico evaluation of the ADMET profile of the StreptomeDB database. *SpringerPlus*, 2(1), 1-11.
- Numan, M., Bukhari, S. A., Rehman, M. U., Mustafa, G., and Sadia, B. (2021). Phylogenetic analyses, protein modeling and active site prediction of two pathogenesis related (PR2 and PR3) genes from bread wheat. *Plos one*, 16(9), e0257392.
- O'Brien, P. A. (2017). Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*, 46(4), 293-304.
- Olivain, C., and Alabouvette, C. (1999). Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. *The New Phytologist*, 141(3), 497-510.
- Oliveira, J. C., Sales, J. F., Rubio-Neto, A., Silva, C. F., Soares, M. A., and Silva, F. G. (2020). Biological control in the germination of seeds from two species native of the Cerrado region. *Brazilian Journal of Biology*, (AHEAD).
- Onofre, S. B., Abatti, D., Refosco, D., Tessaro, A. A., Onofre, J. A. B., and Tessaro, A. B. (2016). Characterization of α -amylase produced by the endophytic strain of *Penicillium digitatum* in solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SMF). *African Journal of Biotechnology*, 15(28), 1511-1519.
- Ownley, B. H., Griffin, M. R., Klingeman, W. E., Gwinn, K. D., Moulton, J. K., and Pereira, R. M. (2008). *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *Journal of invertebrate pathology*, 98(3), 267-270.
- Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., and Suh, J. W. (2013). Extracellular proteases from *Streptomyces phaeopurpureus* E x P ro138 inhibit spore adhesion, germination and appressorium formation in *Colletotrichum coccodes*. *Journal of applied microbiology*, 115(1), 207-217.
- Pan, X., and Kortemme, T. (2021). Recent advances in de novo protein design: Principles, methods, and applications. *Journal of Biological Chemistry*, 100558.
- Panagopoulou, P., Filioti, J., Farmaki, E., Maloukou, A., and Roilides, E. (2007). Filamentous Fungi in a Tertiary Care Hospital Environmental Surveillance and Susceptibility to Antifungal Drugs. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 28(1), 60-67.

- Panaiyadiyan, P., and Chellaia, S. R. (2011). Biodiversity of microorganisms isolated from rhizosphere soils of Pachamalai Hills, Tamilnadu, India. *Research Journal of Forestry*, 5(1), 27-35.
- Pandey, N., Dhakar, K., Jain, R., and Pandey, A. (2016). Temperature dependent lipase production from cold and pH tolerant species of *Penicillium*. *Mycosphere*, 7(10), 1533-1545.
- Pankhurst, C. E., and Lynch, J. M. (2005). Biocontrol of soil-borne plant diseases. p133.
- Panpatte, D. G., Jhala, Y. K., Shelat, H. N., and Vyas, R. V. (2016). *Pseudomonas fluorescens*: a promising biocontrol agent and PGPR for sustainable agriculture. In *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity* (pp. 257-270). Springer, New Delhi.
- Pantsar, T., and Poso, A. (2018). Binding affinity via docking: fact and fiction. *Molecules*, 23(8), 1899.
- Paquet, E., and Viktor, H. L. (2015). Molecular dynamics, monte carlo simulations, and langevin dynamics: a computational review. *BioMed research international*, 2015.
- Pardridge, W. M. (2012). Drug transport across the blood–brain barrier. *Journal of cerebral blood flow & metabolism*, 32(11), 1959-1972.
- Park, M. S., Lee, J. W., Kim, S. H., Park, J. H., You, Y. H., and Lim, Y. W. (2020). *Penicillium* from rhizosphere soil in terrestrial and coastal environments in South Korea. *Mycobiology*, 48(6), 431-442.
- Parmar, B. C., Nayak, J. B., Brahmabhatt, M. N., Chaudhary, J. H., Patel, S. A., and Gida, H. K. (2018). Prevalence of dermatophytosis in animal and human population with special reference to its zoonotic significance. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 6(5), 687-691.
- Parvin, I., Mondal, C., Sultana, S., Sultana, N., and Aminuzzaman, F. M. (2021). Pathological Survey on Early Leaf Blight of Tomato and In Vitro Effect of Culture Media, Temperature and pH on Growth and Sporulation of *Alternaria solani*. *Open Access Library Journal*, 8(3), 1-17.
- Pastor, F. J., and Guarro, J. (2008). *Alternaria* infections: laboratory diagnosis and relevant clinical features. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(8), 734-746.
- Patel, J. K., Madaan, S., and Archana, G. (2018). Antibiotic producing endophytic *Streptomyces* spp. colonize above-ground plant parts and promote shoot growth in multiple healthy and pathogen-challenged cereal crops. *Microbiological research*, 215, 36-45.

- Patel, J. S., Yadav, S. K., Bajpai, R., Teli, B., and Rashid, M. (2020). PGPR secondary metabolites: an active syrup for improvement of plant health. In *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture* (pp. 195-208). Academic Press.
- Patriarca, A., and Pinto, V. (2018). *Alternaria*. Reference Module in Food Science. doi:10.1016/b978-0-08-100596-5.22572-9
- Pazouki, M., and Panda, T. (2000). Understanding the morphology of fungi. *Bioprocess Engineering*, 22(2), 127-143.
- Pellan, L., Durand, N., Martinez, V., Fontana, A., Schorr-Galindo, S., and Strub, C. (2020). Commercial biocontrol agents reveal contrasting compartments against two mycotoxigenic fungi in cereals: *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*. *Toxins*, 12(3), 152.
- Peng, G., Zhang, W., Luo, H., Xie, H., Lai, W., and Tan, Z. (2009). *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(7), 1650-1655.
- Peng, J., and Xu, J. (2009, May). Boosting protein threading accuracy. In *Annual International Conference on Research in Computational Molecular Biology* (pp. 31-45). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Peng, Y. H., Chou, Y. J., Liu, Y. C., Jen, J. F., Chung, K. R., and Huang, J. W. (2017). Inhibition of cucumber *Pythium damping-off* pathogen with zoosporicidal biosurfactants produced by *Bacillus mycoides*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124(5), 481-491.
- Perera, D. D. B. D., and Peiris, D. (2020). A benchmarked in-silico driven pipeline capable of complete trifecta protein analysis.
- Petrey, D., and Honig, B. (2005). Protein structure prediction: inroads to biology. *Molecular cell*, 20(6), 811-819.
- Peypoux, F., Bonmatin, J. M., and Wallach, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied microbiology and biotechnology*, 51(5), 553-563.
- Piechota, P. (2015). Development of in silico models for the prediction of toxicity incorporating ADME information. Liverpool John Moores University (United Kingdom).

- Pinto, C. R. O., and Nahas, E. (2002). Atividade e população microbiana envolvida nas transformações do enxofre em solos com diferentes vegetações. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37, 1751-1756.
- Pitt, J. I., and Hocking, A. D. (1997). Fungi and mycotoxins in foods. *fungi of Australia*, 1, 315-342.
- Poria, V., Rana, A., Kumari, A., Grewal, J., Pranaw, K., and Singh, S. (2021). Current perspectives on chitinolytic enzymes and their agro-industrial applications. *Biology*, 10(12), 1319.
- Pourseif, M. M., Yousefpour, M., Aminianfar, M., Moghaddam, G., and Nematollahi, A. (2019). A multi-method and structure-based in silico vaccine designing against *Echinococcus granulosus* through investigating enolase protein. *BioImpacts: BI*, 9(3), 131.
- Poveda, J., and Baptista, P. (2021). Filamentous fungi as biocontrol agents in olive (*Olea europaea* L.) diseases: Mycorrhizal and endophytic fungi. *Crop Protection*, 146, 105672.
- Powers, S. K., and Sen, C. K. (2000). Physiological antioxidants and exercise training. In *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise* (pp. 221-242). Elsevier Science BV.
- Prakash, D., Nawani, N., Prakash, M., Bodas, M., Mandal, A., Khetmalas, M., and Kapadnis, B. (2013). Actinomycetes: a repertory of green catalysts with a potential revenue resource. *BioMed research international*, 2013.
- Prashar, P., Kapoor, N., and Sachdeva, S. (2014). Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 13(1), 63-77.
- Prieto-Martínez, F. D., Arciniega, M., and Medina-Franco, J. L. (2018). Molecular docking: current advances and challenges. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 21.
- Prudence, S. M., Addington, E., Castaño-Espriu, L., Mark, D. R., Pintor-Escobar, L., Russell, A. H., and McLean, T. C. (2020). Advances in actinomycete research: an ActinoBase review of 2019. *Microbiology*, 166(8), 683.
- Pusz, W. (2009). Morpho-physiological and molecular analyses of *Alternaria alternata* isolated from seeds of *Amaranthus*. *Phytopathologia*, 54, 5-14.
- Pusztahelyi, T., Holb, I. J., and Pócsi, I. (2015). Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in plant science*, 6, 573.
- Rachedi, K., Zermane, F., Tir, R., Ayache, F., Duran, R., Lauga, B., Karama, S., Simon, M., and Boulahrouf, A. (2018). Effect of sulfonylurea tribenuron methyl herbicide on soil

Actinobacteria growth and characterization of resistant strains. *brazilian journal of microbiology*, 49, 79-86.

- Rafique, M., Hayat, K., Mukhtar, T., Khan, A. A., Afridi, M. S., Hussain, T., Sultan, T., Munis, M. F. H., Imran, M., and Chaudhary, H. J. (2015). Bacterial biofilm formation and its role against agricultural pathogens. *The battle against microbial pathogens: Basic Science, Technological advances and educational programs. Spain: Formatex research Center*, 373-382.
- Rahman, M. A., Begum, M. F., and Alam, M. F. (2009). Screening of Trichoderma isolates as a biological control agent against Ceratocystis paradoxa causing pineapple disease of sugarcane. *Mycobiology*, 37(4), 277-285.
- Rahman, M. A., Rahman, M. A., Moni, Z. R., and Rahman, M. A. (2020). Evaluation of Bio-Control Efficacy of Trichoderma Strains against Alternaria alternata Causing Leaf Blight of Ashwagandha [Withania somnifera (L.) Dunal]. *Journal of Forest and Environmental Science*, 36(3), 207-218.
- Rahman, M. M., Ali, M. E., Khan, A. A., Akanda, A. M., Uddin, M., Hashim, U., and Abd Hamid, S. B. (2012). Isolation, characterization, and identification of biological control agent for potato soft rot in Bangladesh. *The Scientific World Journal*, 2012.
- Rai, D. K., and Rieder, E. (2012). Homology modeling and analysis of structure predictions of the bovine rhinitis B virus RNA dependent RNA polymerase (RdRp). *International journal of molecular sciences*, 13(7), 8998-9013.
- Rai, P. K., and Kumari, L. (2009). Variability in *Alternaria alternata* infecting periwinkle (*Catharanthus roseus*). *Progressive Agriculture*, 9(2), 269-272.
- Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C., and Sasisekharan, V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of molecular biology*, 7, 95-99. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(63\)80023-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(63)80023-6)
- Ramírez, D., and Caballero, J. (2018). Is it reliable to take the molecular docking top scoring position as the best solution without considering available structural data? *Molecules*, 23(5), 1038.
- Ramnath, L., Sithole, B., and Govinden, R. (2017). Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to Eucalyptus wood species for application in the pulping industry. *Biotechnology Reports*, 15, 114-124.

- Ran, L. X., Liu, C. Y., Wu, G. J., van Loon, L. C., and Bakker, P. A. H. M. (2005). Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China. *Biological Control*, 32(1), 111–120.
- Rauf, M. A. (2017). In Vivo/In Situ Animal Models. In *Nanotechnology Methods for Neurological Diseases and Brain Tumors* (pp. 187-195). Academic Press.
- Raymaekers, K., Ponet, L., Holtappels, D., Berckmans, B., and Cammue, B. P. (2020). Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management—a review. *Biological Control*, 144, 104240.
- Reddy, P. P. (2014). Plant growth promoting rhizobacteria for horticultural crop protection. Springer India.
- Rehman, I., Kerndt, C. C., and Botelho, S. (2017). Biochemistry, Tertiary Protein Structure.
- Rella, A., Farnoud, A. M., and Del Poeta, M. (2016). Plasma membrane lipids and their role in fungal virulence. *Progress in lipid research*, 61, 63-72.
- Rengasamy, S., and Thangaprakasam, U. (2018). Isolation, screening and determination of α -amylase activity from marine *Streptomyces* species. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 10(4), 122-127.
- Reponen, T. A., Gazenko, S. V., Grinshpun, S. A., Willeke, K., and Cole, E. C. (1998). Characteristics of airborne actinomycete spores. *Applied and environmental microbiology*, 64(10), 3807-3812.
- Reyes, M. G., Hernández, R. B., Rodríguez, G. V., Olivares, C. C., Moreno, S. M., Santillán, L. J., and Constantino, C. L. (2017). Formation, morphology and biotechnological applications of filamentous fungal pellets: A review. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(3), 703-720.
- Robeson, D. J., and Strobel, G. A. (1981). A β -Dehydrocurvularin and curvularin from *Alternaria cinerariae*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 36(11-12), 1081-1083.
- Roca-Couso, R., Flores-Félix, J. D., and Rivas, R. (2021). Mechanisms of action of microbial biocontrol agents against *Botrytis cinerea*. *Journal of Fungi*, 7(12), 1045.
- Romano-Armada, N., Yañez-Yazlle, M. F., Irazusta, V. P., Rajal, V. B., and Moraga, N. B. (2020). Potential of bioremediation and pgp traits in streptomyces as strategies for bio-reclamation of salt-affected soils for agriculture. *Pathogens*, 9(2), 117.

- Rosas-Medina, M., Maciá-Vicente, J. G., and Piepenbring, M. (2020). Diversity of Fungi in Soils with Different Degrees of Degradation in Germany and Panama. *Mycobiology*, 48(1), 20-28.
- Roy, A., and Zhang, Y. (2012). Protein structure prediction. *eLS*.
- Roy, K., Dey, S., Uddin, M., Barua, R., and Hossain, M. (2018). Extracellular pectinase from a novel bacterium *Chryseobacterium indologenes* strain SD and its application in fruit juice clarification. *Enzyme research*, 2018.
- Roy, S., Narang, B. K., Gupta, M. K., Abbot, V., Singh, V., and Rawal, R. K. (2018). Molecular docking studies on isocytosine analogues as xanthine oxidase inhibitors. *Drug research*, 68(07), 395-402.
- Ryu, C. M., Choi, H. K., Lee, C. H., Murphy, J. F., Lee, J. K., and Kloepper, J. W. (2013). Modulation of quorum sensing in acylhomoserine lactone-producing or-degrading tobacco plants leads to alteration of induced systemic resistance elicited by the rhizobacterium *Serratia marcescens* 90-166. *The plant pathology journal*, 29(2), 182.
- Sabaou, N., Bounaga, N., and Bounaga, D. (1983). Actions antibiotique, mycolytique et parasitaire de deux actinomycètes envers *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et autres formae speciales. *Canadian Journal of Microbiology*, 29(2), 194-199.
- Saif, F. A., Yaseen, S. A., Alameen, A. S., Mane, S. B., and Undre, P. B. (2021). Identification and characterization of *Aspergillus* species of fruit rot fungi using microscopy, FT-IR, Raman and UV–Vis spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 246, 119010.
- Saini, A., Aggarwal, N. K., Sharma, A., and Yadav, A. (2015). Actinomycetes: a source of lignocellulolytic enzymes. *Enzyme research*, 2015.
- Saleh, S. S., and Glick, B. R. (2001). Involvement of *gacS* and *rpoS* in enhancement of the plant growth-promoting capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(8), 698-705.
- Salehghamari, E., Nasrollahzadeh, Z., Tahmaseb, M., and Amoozegar, M. A. (2019). Pectinase enzyme from *Streptomyces coelicoflavus* GIAL86 isolated from Meyghan Salt Lake, Arak, Iran. *International Journal of Aquatic Biology*, 7(2), 106-111.
- Salsbury Jr, F. R. (2010). Molecular dynamics simulations of protein dynamics and their relevance to drug discovery. *Current opinion in pharmacology*, 10(6), 738-744.

- Sanomiya, L. T., and Nahas, E. (2003). Microrganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio do solo. *Ciência Rural*, 33, 835-842.
- Santaella, C., Schue, M., Berge, O., Heulin, T., and Achouak, W. (2008). The exopolysaccharide of *Rhizobium* sp. YAS34 is not necessary for biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* roots but contributes to root colonization. *Environmental Microbiology*, 10(8), 2150-2163.
- Sanvictores, T., and Farci, F. (2020). Biochemistry, Primary Protein Structure. *StatPearls [Internet]*.
- Sapundzhi, F., Prodanova, K., and Lazarova, M. (2019, November). Survey of the scoring functions for protein-ligand docking. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2172, No. 1, p. 100008). AIP Publishing LLC.
- Saravanakumar, K., Dou, K., Lu, Z., Wang, X., Li, Y., and Chen, J. (2018). Enhanced biocontrol activity of cellulase from *Trichoderma harzianum* against *Fusarium graminearum* through activation of defense-related genes in maize. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 103, 130-136.
- Saravanakumar, K., Fan, L., Fu, K., Yu, C., Wang, M., Xia, H., San, J., Li, Y., and Chen, J. (2016). Cellulase from *Trichoderma harzianum* interacts with roots and triggers induced systemic resistance to foliar disease in maize. *Scientific reports*, 6(1), 1-18.
- Sarkar, B., Ullah, M. A., and Prottoy, M. N. I. (2020). Computational exploration of phytochemicals as potent inhibitors of acetylcholinesterase enzyme in Alzheimer's disease. *medRxiv*.
- Sarven, M., Hao, Q., Deng, J., Yang, F., Wang, G., Xiao, Y., and Xiao, X. (2020). Biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Pathogens*, 9(3), 213.
- Sastry, G. M., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., and Sherman, W. (2013). Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of computer-aided molecular design*, 27(3), 221-234.
- Sato, I., Shimizu, M., Hoshino, T., and Takaya, N. (2009). The glutathione system of *Aspergillus nidulans* involves a fungus-specific glutathione S-transferase. *Journal of Biological Chemistry*, 284(12), 8042-8053.
- Satyanarayana, T., Deshmukh, S. K., and Deshpande, M. V. (Eds.). (2019). *Advancing frontiers in mycology & mycotechnology: basic and applied aspects of fungi*. Springer Nature.

- Sawada, H., Ieki, H., Oyaizu, H., and Matsumoto, S. (1993). Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(4), 694-702.
- Saxena, P., Srivastava, J., Pandey, S., Srivastava, S., Maurya, N., Kaushik, N. C., and Vats, S. (2019). Plants for Biocontrol and Biological Control of Plant Pathogens. In *Plant Biotic Interactions* (pp. 147-179). Springer, Cham.
- Schneck, V., and Kuhn, L. A. (2000). Virtual screening with solvation and ligand-induced complementarity. *Virtual Screening: An Alternative or Complement to High Throughput Screening?* 171-190.
- Sefid, F., Rasooli, I., and Jahangiri, A. (2013). In silico determination and validation of *Baumannii acinetobactin* utilization a structure and ligand binding site. *BioMed research international*, 2013.
- Segaran, G., Sundar, R. D. V., Settu, S., Shankar, S., and Sathiavelu, M. (2017). A review on endophytic actinomycetes and their applications. *J Chem Pharm Res*, 9(10), 152-158.
- Selim, M. S. M., Abdelhamid, S. A., and Mohamed, S. S. (2021). Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 1-13.
- Sellitto, V. M., Golubkina, N. A., Pietrantonio, L., Cozzolino, E., Cuciniello, A., Cenvinzo, V., Florin, I., and Caruso, G. (2019). Tomato yield, quality, mineral composition and antioxidants as affected by beneficial microorganisms under soil salinity induced by balanced nutrient solutions. *Agriculture*, 9(5), 110.
- Sellitto, V. M., Zara, S., Fracchetti, F., Capozzi, V., and Nardi, T. (2021). Microbial biocontrol as an alternative to synthetic fungicides: Boundaries between pre-and postharvest applications on vegetables and fruits. *Fermentation*, 7(2), 60.
- Sempere, F., and Santamarina, M. P. (2010). Study of the interactions between *Penicillium oxalicum* Currie & Thom and *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3), 700-706.
- Senthivelan, T., Kanagaraj, J., Panda, R. C., and Narayani, T. (2019). Screening and production of a potential extracellular fungal laccase from *Penicillium chrysogenum*: media

optimization by response surface methodology (RSM) and central composite rotatable design (CCRD). *Biotechnology Reports*, 23, e00344.

- Sethi, B. K., Jana, A., Nanda, P. K., Das Mohapatra, P. K., Sahoo, S. L., and Patra, J. K. (2016). Production of α -amylase by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using pearl millet and its structural characterization. *Frontiers in plant science*, 7, 639.
- Settivari, R. S., Rowlands, J. C., Wilson, D. M., Arnold, S. M., and Spencer, P. J. (2017). Application of evolving computational and biological platforms for chemical safety assessment. In *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development* (pp. 843-873). Academic Press.
- Shah, N., Gislason, A. S., Becker, M., Belmonte, M. F., Fernando, W. D., and de Kievit, T. R. (2020). Investigation of the quorum-sensing regulon of the biocontrol bacterium *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23. *Plos one*, 15(2), e0226232.
- Shaikh, S., Shaikh, I., and Dixit, P. (2020). Production and characterization of laccase from *Aspergillus terreus* isolated from saw mill soil of Osmanabad *Int. J. of Adv. Res.* 8 (Sep). 626-632] (ISSN 2320-5407).
- Shali, A., Ghasemi, S., Ahmadian, G., Ranjbar, G., Dehestani, A., Khalesi, N., and Vahed, M. (2010). *Bacillus pumilus* SG2 chitinases induced and regulated by chitin, show inhibitory activity against *Fusarium graminearum* and *Bipolaris sorokiniana*. *Phytoparasitica*, 38(2), 141-147.
- Sharma, A. (2019). Fungi as biological control agents. In *Biofertilizers for sustainable agriculture and environment* (pp. 395-411). Springer, Cham.
- Sharma, G. P. R. R. (2010). Influence of culture media on growth, colony character and sporulation of fungi isolated from decaying vegetable wastes. *Journal of yeast and fungal research*, 1(8), 157-164.
- Sharma, M., Dangi, P., and Choudhary, M. (2014). Actinomycetes: source, identification, and their applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2), 801-832.
- Shen, M. Y., and Sali, A. (2006). Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein science*, 15(11), 2507-2524.
- Shen, X. X., Steenwyk, J. L., LaBella, A. L., Opulente, D. A., Zhou, X., Kominek, J., Li, Y., Groenewald, M., Hittinger, C. T., and Rokas, A. (2020). Genome-scale phylogeny and

- contrasting modes of genome evolution in the fungal phylum Ascomycota. *Science advances*, 6(45), eabd0079.
- Shi, J. F., and Sun, C. Q. (2017). Isolation, identification, and biocontrol of antagonistic bacterium against *Botrytis cinerea* after tomato harvest. *brazilian journal of microbiology*, 48, 706-714.
 - Shoichet, B. K., McGovern, S. L., Wei, B., and Irwin, J. J. (2002). Lead discovery using molecular docking. *Current opinion in chemical biology*, 6(4), 439-446.
 - Siameto, E. N., Okoth, S., Amugune, N. O., and Chege, N. C. (2010). Antagonism of *Trichoderma farzianum* isolates on soil borne plant pathogenic fungi from Embu District, Kenya. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 1(3), 47-54.
 - Siciliano, I., Gilardi, G., Ortu, G., Gisi, U., Gullino, M. L., and Garibaldi, A. (2017). Identification and characterization of *Alternaria* species causing leaf spot on cabbage, cauliflower, wild and cultivated rocket by using molecular and morphological features and mycotoxin production. *European Journal of Plant Pathology*, 149(2), 401-413.
 - Siddiqui, I. A., and Shaikat, S. S. (2003). Plant species, host age and host genotype effects on *Meloidogyne incognita* biocontrol by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its genetically-modified derivatives. *Journal of Phytopathology*, 151(4), 231–238.
 - Siebers, M., Brands, M., Wewer, V., Duan, Y., Hölzl, G., and Dörmann, P. (2016). Lipids in plant–microbe interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(9), 1379-1395.
 - Singh, A., Vanga, S. K., Orsat, V., and Raghavan, V. (2018). Application of molecular dynamic simulation to study food proteins: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(16), 2779-2789.
 - Singh, G., and Kaur, M. (1996). A molecular docking mechanism model for benzimidazole to inactivate glutathione reductase in chickpea.
 - Singh, G., Tiwari, A., Choudhir, G., Kumar, A., and Sharma, S. (2021). Unraveling the potential role of bioactive molecules produced by *Trichoderma* spp. as inhibitors of tomatinase enzyme having an important role in wilting disease: an in-silico approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-10.
 - Singh, H. B. (2014). Management of plant pathogens with microorganisms. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 2, 443-454.

- Singh, H., Naik, B., Kumar, V., and Bisht, G. S. (2018). Screening of endophytic actinomycetes for their herbicidal activity. *Annals of Agrarian Science*, 16(2), 101-107.
- Singh, H., Singh, S., and Raghava, G. P. (2014). Evaluation of protein dihedral angle prediction methods. *PloS one*, 9(8), e105667.
- Singh, L. S., Sharma, H., and Talukdar, N. C. (2014). Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India. *BMC microbiology*, 14(1), 1-13.
- Singh, S., Bhatnagar, S., Choudhary, S., Nirwan, B., and Sharma, K. (2018). Fungi as Biocontrol Agent: An Alternate to Chemicals. In *Fungi and their Role in Sustainable Development: Current Perspectives* (pp. 23-33). Springer, Singapore.
- Sippl, M. J. (1993). Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 17(4), 355-362.
- Sire, A., and Amouroux, I. (2016). Avantages et limites du recours aux BCF-BAF pour produire des VGE mollusques équivalentes aux NQE définies dans l'eau (DCE-Directive 2013/39/UE).
- Sivaraman, G. K., Visnuvinayagam, S., Jha, A. K., Remya, S., Renuka, V., Ajeesh, K., and Vanik, D. (2018). Molecular divergence and identification of *Aspergillus* species in dry fishes of Gujarat, India. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 88(2), 505-515.
- Sivasakthi, S., Usharani, G., and Saranraj, P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African journal of agricultural research*, 9(16), 1265-1277.
- Skariyachan, S., and Garka, S. (2018). Exploring the binding potential of carbon nanotubes and fullerene towards major drug targets of multidrug resistant bacterial pathogens and their utility as novel therapeutic agents. In *Fullerens, Graphenes and Nanotubes* (pp. 1-29). William Andrew Publishing.
- Skidmore, A. M., and Dickinson, C. H. (1976). Colony interactions and hyphal interference between *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 66(1), 57-64.

- Smaoui, S., Mathieu, F., Fourati Ben Fguira, L., Merlina, G., and Mellouli, L. (2011). Taxonomy and antimicrobial activities of a new *Streptomyces* sp. TN17 isolated in the soil from an oasis in Tunis. *Archives of Biological Sciences*, 63(4), 1047-1056.
- Smati, M., and Kitouni, M. (2019). Diversity of actinobacteria in the marshes of Ezzemoul and Djendli in northeastern Algeria. *European Journal of Ecology*, 5(2), 41-53.
- Sobolev, O. V., Afonine, P. V., Moriarty, N. W., Hekkelman, M. L., Joosten, R. P., Perrakis, A., and Adams, P. D. (2020). A global Ramachandran score identifies protein structures with unlikely stereochemistry. *Structure*, 28(11), 1249-1258.
- Sofi, T. A., Beig, M. A., Dar, G. H., Ahmad, M., Hamid, A., Ahangar, F. A., Padder, B. A., and Shah, M. D. (2013). Cultural, morphological, pathogenic and molecular characterization of *Alternaria mali* associated with *Alternaria* leaf blotch of apple. *African Journal of Biotechnology*, 12(4).
- Somappa, J., Srivastava, K., Sarma, B. K., Pal, C. H. H. A. T. T. A. R., and Kumar, R. A. V. I. N. D. R. A. (2013). Studies on growth conditions of the tomato *Alternaria* leaf spot causing *Alternaria solani* L. *The bioscan*, 8(1), 101-104.
- Sousa, S. F., Fernandes, P. A., and Ramos, M. J. (2006). Protein–ligand docking: current status and future challenges. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65(1), 15-26.
- Souza, P. M. D., Bittencourt, M. L. D. A., Caprara, C. C., Freitas, M. D., Almeida, R. P. C. D., Silveira, D., and Magalhães, P. O. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 337-346.
- Sreelakshmi, V., Raj, N., and Abraham, A. (2017). Evaluation of the drug-like properties of Kaempferol, Chrysophanol and Emodin and their interactions with EGFR tyrosine kinase-an in-silico approach. *Natural Product Communications*, 12(6), 1934578X1701200621.
- Sreevidya, M., and Gopalakrishnan, S. (2016). *Penicillium citrinum* VFI-51 as biocontrol agent to control charcoal rot of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *African journal of Microbiology Research*, 10(19), 669-674.
- Srivastava, R. (2021). Theoretical Studies on the Molecular Properties, Toxicity, and Biological Efficacy of 21 New Chemical Entities. *ACS omega*, 6(38), 24891-24901.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A., and Ward-Rainey, N. L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(2), 479-491.
- Stangarlin, J. R., Kuhn, O. J., Assi, L., and Schwan-Estrada, K. R. F. (2011). Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. *Science against microbial*

pathogens: communicating current research and technological advances. Badajoz : Formatex, 2, 1033-1042.

- Steddom, K., and Menge, J. A. (2001). Evaluation of continuous application technology for delivery of the biocontrol agent *Pseudomonas putida* 06909-rif/nal. *Plant disease*, 85(4), 387-392.
- Steele, J. A., Durbin, R. D., Uchytíl, T. F., and Rich, D. H. (1978). Tentoxin—uncompetitive inhibitor of lettuce chloroplast coupling factor-1. *Biochim. Biophys. Acta.* 501, 72–82.
- Stenberg, J. A., Sundh, I., Becher, P. G., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P. A., Gil, J. F., Jensen, D. F., Jonsson, M., Karlsson, M., Khalil, S., Ninkovic, V., Rehmann, G., Vetukuri, R. R and Viketoft, M. (2021). When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science*, 94(3), 665-676.
- Stergiopoulos, I., and de Wit, P. J. (2009). Fungal effector proteins. *Annual review of phytopathology*, 47, 233-263.
- Stockwell, V. O., Moore, L. W., and Loper, J. E. (1993). Fate of *Agrobacterium radiobacter* K84 in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(7), 2112-2120.
- Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A. M., Gumienny, R., Haas, J., and Schwede, T. (2020). QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*, 36(6), 1765-1771.
- Sudha, P. N., Sangeetha, K., Kumari, A. V. J., Radha, E., Vanisri, N., Aisverya, S., and Anil, S. (2018). In vivo biocompatibility studies: Perspectives on evaluation of biomedical polymer biocompatibility. In *Fundamental Biomaterials: Polymers* (pp. 217-247). Woodhead Publishing.
- Sugiharto, S. (2019). A review of filamentous fungi in broiler production. *Annals of Agricultural Sciences*, 64(1), 1-8.
- Sukmawati, D., Arman, Z., Sondana, G. A., Fikriyah, N. N., Hasanah, R., Afifah, Z. N., Balqis, M., Enshasy, H.E., Husna, S. N. A., Rahayu, S., Kurniati, T.H., and Puspitaningrum, R. (2019, December). Potential amylase-producing yeast isolated from indigenous fermented beverages originating from Bali, Indonesia. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1402, No. 5, p. 055021). IOP Publishing.
- Suleman, P., Al-Musallam, A., and Menezes, C. A. (2002). The effect of biofungicide

Mycostop on *Ceratocystis radicola*, the causal agent of black scorch on date palm. *BioControl*, 47(2), 207-216.

- Suzzi, G., Romano, P., Ponti, I., and Montuschi, C. (1995). Natural wine yeasts as biocontrol agents. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(3), 304-308.
- Swiontek Brzezinska, M., Jankiewicz, U., Burkowska, A., and Walczak, M. (2014). Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. *Current microbiology*, 68(1), 71-81.
- Tairum Jr, C. A., de Oliveira, M. A., Horta, B. B., Zara, F. J., and Netto, L. E. (2012). Disulfide biochemistry in 2-cys peroxiredoxin: requirement of Glu50 and Arg146 for the reduction of yeast Tsa1 by thioredoxin. *Journal of molecular biology*, 424(1-2), 28-41.
- Takei, Y., and Ishida, T. (2022). A Benchmark Dataset for Evaluating Practical Performance of Model Quality Assessment of Homology Models. *Bioengineering*, 9(3), 118.
- Tanner, J. J. (2016). Empirical power laws for the radii of gyration of protein oligomers. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 72(10), 1119-1129.
- Tao, X., Huang, Y., Wang, C., Chen, F., Yang, L., Ling, L., Che, Z., and Chen, X. (2020). Recent developments in molecular docking technology applied in food science: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(1), 33-45.
- Thakur, S., and Harsh, N. S. K. (2014). Efficacy of volatile metabolites of phylloplane fungi of *Rauwolfia serpentina* against *Alternaria alternata*. *Forest Pathology*, 1(2).
- Thambugala, K. M., Daranagama, D. A., Phillips, A. J., Kannangara, S. D., and Promputtha, I. (2020). Fungi vs. fungi in biocontrol: An overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 718.
- Thangavelu, B., Pavlovsky, A. G., and Viola, R. (2014). Structure of homoserine O-acetyltransferase from *Staphylococcus aureus*: the first Gram-positive ortholog structure. *Acta Crystallographica Section F : Structural Biology Communications*, 70(10), 1340-1345.
- Thompson, J. E., Fahnestock, S., Farrall, L., Liao, D. I., Valent, B., and Jordan, D. B. (2000). The second Naphthol reductase of fungal melanin biosynthesis in *Magnaporthe grisea*: Tetrahydroxynaphthalene reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(45), 34867-34872.
- Thön, M., Al-Abdallah, Q., Hortschansky, P., and Brakhage, A. A. (2007). The thioredoxin system of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*: impact on development and oxidative stress response. *Journal of Biological Chemistry*, 282(37), 27259-27269.

- Thuleau, P., Graziana, A., Rossignol, M., Kauss, H., Auriol, P., and Ranjeva, R. (1988). Binding of the phytotoxin zinniol stimulates the entry of calcium into plant-protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 5932–5935. Doi : 10.1073/pnas.85.16.5932
- Tlemsani, M., Fortas, Z., Dib, S., and Bellahcen, M. (2020). In vitro antagonism between actinomycete isolates and *Fusarium oxysporum* f. sp. Ciceri: The causative agent of chickpeavascularwilt. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 10(4), 255-267.
- Toffano, L., Fialho, M. B., and Pascholati, S. F. (2017). Potential of fumigation of orange fruits with volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* to control citrus black spot disease at postharvest. *Biological control*, 108, 77-82.
- Tomer, A., and Diwivedi, S. K. (2020). A review on Early blight of Tomato menacing disease caused by *Alternaria solani*. *Eur. J. Mol. Clin. Med.*, 7, 2328-2334.
- Toporova, L., and Balaguer, P. (2020). Nuclear receptors are the major targets of endocrine disrupting chemicals. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 502, 110665.
- Torres, P. H., Sodero, A. C., Jofily, P., and Silva-Jr, F. P. (2019). Key topics in molecular docking for drug design. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4574.
- Traxler, M. F., and Rozen, D. E. (2022). Ecological drivers of division of labour in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology*, 67, 102148.
- Tripathi, A., and Misra, K. (2017). Molecular docking: A structure-based drug designing approach. *JSM Chem*, 5(2), 1042-1047.
- Trott, O., and Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.
- Trust, T. J. (1975). Antibacterial activity of tropolone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7(5), 500-506.
- Tsang, C. C., Tang, J. Y., Lau, S. K., and Woo, P. C. (2018). Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era—Past, present and future. *Computational and structural biotechnology journal*, 16, 197-210.
- Tsuge, T., Harimoto, Y., Akamatsu, K., Ohtani, K., Kodama, M., Akagi, Y., Egusa, M., Yamamoto, M., and Otani, H. (2013). Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 44–66. Doi : 10.1111/j.1574-6976.2012.00350.x
- Turnbull, P. C., Kramer, J. M., and Melling, J. (1991). *Bacillus*. *Manual of clinical*

microbiology, 5, 296-303.

- Udhayashree, N., Senbagam, D., Senthilkumar, B., Nithya, K., and Gurusamy, R. (2012). Production of bacteriocin and their application in food products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1), S406-S410.
- Undabarrena, A., Pereira, C. F., Kruasuwan, W., Parra, J., Sélem-Mojica, N., Vind, K., and Schniete, J. K. (2021). Integrating perspectives in actinomycete research: an ActinoBase review of 2020-21. *Microbiology*, 167(9).
- Vaijayanthi, G., Vijayakumar, R., and Dhanasekaran, D. (2016). Actinobacteria—a biofactory of novel enzymes. *Actinobacteria-basics and biotechnological applications. InTechOpen, London*, 329-352.
- Vaijayanthi, G., Vijayakumar, R., and Dhanasekaran, D. (2016). Actinobacteria—a biofactory of novel enzymes. *Actinobacteria-basics and biotechnological applications. InTechOpen, London*, 329-352.
- Van Bergeijk, D. A., Terlouw, B. R., Medema, M. H., and van Wezel, G. P. (2020). Ecology and genomics of *Actinobacteria*: new concepts for natural product discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10), 546-558.
- Van der Meij, A., Worsley, S. F., Hutchings, M. I., and van Wezel, G. P. (2017). Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS microbiology reviews*, 41(3), 392-416.
- Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shim, J., Darian, E., Guvench, O., Lopes, P., Vorobyov, I., and Mackerell Jr, A. D. (2010). CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of computational chemistry*, 31(4), 671-690.
- Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W., and Kopple, K. D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of medicinal chemistry*, 45(12), 2615-2623.
- Veltkamp, R. C. (2001, May). Shape matching: Similarity measures and algorithms. In *Proceedings International Conference on Shape Modeling and Applications* (pp. 188-197). IEEE.
- Venkata- Saileela, M., Venkateswar, R and Venkata- Rao, V. (2017). A review on applications of molecular docking in drug designing. *IAJPS*, 7(04).

- Verma, R. P., and Matthews, E. J. (2015). Estimation of the chemical-induced eye injury using a weight-of-evidence (WoE) battery of 21 artificial neural network (ANN) c-QSAR models (QSAR-21): Part I: Irritation potential. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 71(2), 318-330.
- Vesuna, A. P., and Nerurkar, A. S. (2020). Biocontrol impact of AHL degrading actinobacteria on quorum sensing regulated virulence of phytopathogen *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* BR1. *Plant and Soil*, 453(1), 371-388.
- Vetriani, C., Maeder, D. L., Tolliday, N., Yip, K. S. P., Stillman, T. J., Britton, K. L., and Robb, F. T. (1998). Protein thermostability above 100 C: a key role for ionic interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(21), 12300-12305.
- Viaene, T., Langendries, S., Beirinckx, S., Maes, M., and Goormachtig, S. (2016). *Streptomyces* as a plant's best friend?. *FEMS microbiology ecology*, 92(8).
- Vieira, T., Magalhaes, R., and Sousa, S. (2019). Tailoring specialized scoring functions for more efficient virtual screening. *Frontiers*, 2, 1-4.
- Vincent, D., Rafiqi, M., and Job, D. (2020). The multiple facets of plant–fungal interactions revealed through plant and fungal secretomics. *Frontiers in plant science*, 10, 1626.
- Virani, S. (2018). Synthesis and analysis of pyridine derivatives as small molecule antagonists of cxcr4.
- Von Logau, F. (2004). Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Glutathione, Altruistic Metabolite in Fungi*, 1.
- Vurukonda, S. S. K. P., Giovanardi, D., and Stefani, E. (2018). Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 952.
- Vyas, V. K., Ukawala, R. D., Ghate, M., and Chintha, C. (2012). Homology modeling a fast tool for drug discovery: current perspectives. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 74(1), 1.

- Waechter, F., Weber, E., Hertner, T., and May-Hertl, U. (2010). Cyprodinil: a fungicide of the anilinopyrimidine class. In *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (pp. 1903-1913). Academic Press.
- Waechter, F., Weber, E., Hertner, T., and May-Hertl, U. (2010). Cyprodinil: a fungicide of the anilinopyrimidine class. In *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (pp. 1903-1913). Academic Press.
- Wahid, S. U. H. (2017). Structural and functional characterization of the *Helicobacter pylori* cytidine 5'-monophosphate-pseudaminic acid synthase PseF: molecular insight into substrate recognition and catalysis mechanism. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry : AABC*, 10, 79.
- Wallace, R. L., Hirkala, D. L., and Nelson, L. M. (2017). Postharvest biological control of blue mold of apple by *Pseudomonas fluorescens* during commercial storage and potential modes of action. *Postharvest Biology and Technology*, 133, 1-11.
- Wallen, R. M., and Perlin, M. H. (2018). An overview of the function and maintenance of sexual reproduction in dikaryotic fungi. *Frontiers in microbiology*, 9, 503.
- Wang, M., Sun, X., Yu, D., Xu, J., Chung, K., and Li, H. (2016). Genomic and transcriptomic analyses of the tangerine pathotype of *Alternaria alternata* in response to oxidative stress. *Scientific reports*, 6(1), 1-11.
- Wang, N. N., Dong, J., Deng, Y. H., Zhu, M. F., Wen, M., Yao, Z. J., Lu, A., Wang, J., and Cao, D. S. (2016). ADME properties evaluation in drug discovery: prediction of Caco-2 cell permeability using a combination of NSGA-II and boosting. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 56(4), 763-773.
- Wang, R., Lu, Y., and Wang, S. (2003). Comparative evaluation of 11 scoring functions for molecular docking. *Journal of medicinal chemistry*, 46(12), 2287-2303.
- Wang, X., Liu, X., and Groenewald, J. Z. (2017). Phylogeny of anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota), with contributions from yak in China. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 110(1), 87-103.
- Wang, Y., Bao, Y., Shen, D., Feng, W., Yu, T., Zhang, J., and Zheng, X. D. (2008). Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodosporidium paludigenum* Fell & Tallman. *International journal of food microbiology*, 123(3), 234-239.

- Wang, Y., Ma, R., Li, S., Gong, M., Yao, B., Bai, Y., and Gu, J. (2018). An alkaline and surfactant-tolerant lipase from *Trichoderma lentiforme* ACCC30425 with high application potential in the detergent industry. *AMB Express*, 8(1), 1-11.
- Wang, Y., Xing, J., Xu, Y., Zhou, N., Peng, J., Xiong, Z., Xiong, Z., Liu, X., Luo, X., Luo, C., Chen, K., Zheng, M., and Jiang, H. (2015). In silico ADME/T modelling for rational drug design. *Quarterly reviews of biophysics*, 48(4), 488-515.
- Wang, Y., Zhao, B., Liu, Y., Mao, L., Zhang, X., Meng, W., and Chu, J. (2020). A novel trehalosamine isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* and its antibacterial activities. *AMB Express*, 10(1), 1-7.
- Wang, Z., Yang, H., Wu, Z., Wang, T., Li, W., Tang, Y., and Liu, G. (2018). In silico prediction of blood–brain barrier permeability of compounds by machine learning and resampling methods. *ChemMedChem*, 13(20), 2189-2201.
- Weller, D. M. (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual review of phytopathology*, 26(1), 379-407.
- Weller, D. M. (2007). Pseudomonas biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97(2), 250-256.
- Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., Gardener, B. B. M., and Thomashow, L. S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual review of phytopathology*, 40(1), 309-348.
- Wheeler, G. S., and Schaffner, U. (2013). Improved understanding of weed biological control safety and impact with chemical ecology: a review. *Invasive Plant Science and Management*, 6(1), 16-29.
- Wiederstein, M., and Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W407-W410.
- Wight, W. D., Labuda, R., and Walton, J. D. (2013). Conservation of the genes for HC-toxin biosynthesis in *Alternaria jesenskae*. *BMC Microbiol.* 13 :165. Doi : 10.1186/1471-2180-13-165
- Williams, E. A., Hopson, H., Rodriguez, A., Kongari, R., Bonasera, R., Hernandez-Morales, A. C., and Liu, M. (2019). Complete Genome Sequence of *Serratia marcescens*

Siphophage Serbin. *Microbiol Resour Announc*, 8(19), e00422-19.

- Winiwarter, S., Ridderström, M., Ungell, A. L., Andersson, T. B., and Zamora, I. (2007). Use of molecular descriptors for absorption, distribution, metabolism, and excretion predictions.
- Wink, J., Mohammadipanah, F., and Kazemi Shariat Panahi, H. (2017). Practical aspects of working with actinobacteria. In *Biology and Biotechnology of Actinobacteria* (pp. 329-376). Springer, Cham.
- Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., and Lorito, M. (2014). Trichoderma-based products and their widespread use in agriculture. *The Open Mycology Journal*, 8(1).
- Woudenberg, J. H. (2015). *Restyling Alternaria* (Doctoral dissertation, Wageningen University and Research).
- Wu, F., and Xu, J. (2021). Deep template-based protein structure prediction. *PLoS computational biology*, 17(5), e1008954.
- Wu, G., and Yan, S. (2002). Randomness in the primary structure of protein: methods and implications. *Mol Biol Today*, 3, 55-69.
- Wyatt, T. T., Wösten, H. A., and Dijksterhuis, J. (2013). Fungal spores for dispersion in space and time. *Advances in applied microbiology*, 85, 43-91.
- Xiang, Z. (2006). Advances in homology protein structure modeling. *Current Protein and Peptide Science*, 7(3), 217-227.
- Xiang, Z. (2006). Advances in homology protein structure modeling. *Current Protein and Peptide Science*, 7(3), 217-227.
- Xiao, W., Wang, D., Shen, Z., Li, S., and Li, H. (2018). Multi-body interactions in molecular docking program devised with key water molecules in protein binding sites. *Molecules*, 23(9), 2321.
- Xiaolong, G., Caihuan, K., Mo, Z., Xian, L., Fucun, W., and Ying, L. (2019). Effects of the probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth, immunity, and disease resistance of *Haliotis discus hannai*. *Fish & shellfish immunology*, 94, 617-627.
- Xie, X. H., Fu, X., Yan, X. Y., Peng, W. F., and Kang, L. X. (2021). A Broad-specificity chitinase from *Penicillium oxalicum* k10 exhibits antifungal activity and biodegradation properties of chitin. *Marine Drugs*, 19(7), 356.

- Xiong, G., Wu, Z., Yi, J., Fu, L., Yang, Z., Hsieh, C., Yin, M., Zeng, X., Wu, C., L, A., Chen, X., Hou, T and Cao, D. (2021). ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W5-W14.
- Xu, D., Xue, M., Shen, Z., Jia, X., Hou, X., Lai, D., and Zhou, L. (2021). Phytotoxic Secondary Metabolites from Fungi. *Toxins*, 13(4), 261.
- Xu, J., Li, M., Kim, D., and Xu, Y. (2003). RAPTOR: optimal protein threading by linear programming. *Journal of bioinformatics and computational biology*, 1(01), 95-117.
- Xu, M., Zhang, X., Yu, J., Guo, Z., Wu, J., Li, X., and Wan, S. (2020). Biological control of peanut southern blight (*Sclerotium rolfsii*) by the strain *Bacillus pumilus* LX11. *Biocontrol Science and Technology*, 1-5.
- Yadav, A. R., and Mohite, S. K. (2020). ADME analysis of phytochemical constituents of *Psidium guajava*.
- Yang, C. Y., Wang, R., and Wang, S. (2006). M-score: a knowledge-based potential scoring function accounting for protein atom mobility. *Journal of medicinal chemistry*, 49(20), 5903-5911.
- Yang, S. L., Yu, P. L., and Chung, K. R. (2016). The glutathione peroxidase-mediated reactive oxygen species resistance, fungicide sensitivity and cell wall construction in the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata*. *Environmental microbiology*, 18(3), 923-935.
- Yazici, S., Yanar, Y., and Karaman, I. (2011). Evaluation of bacteria for biological control of early blight disease of tomato. *African Journal of Biotechnology*, 10(9), 1573-1577.
- Yi, Y., Frenzel, E., Spoelder, J., Elzenga, J. T. M., van Elsas, J. D., and Kuipers, O. P. (2018). Optimized fluorescent proteins for the rhizosphere-associated bacterium *Bacillus mycoides* with endophytic and biocontrol agent potential. *Environmental microbiology reports*, 10(1), 57-74.
- Young, D. (2009). Computational Drug Design. John Wiley & Sons, New Jersey, USA.
- Yu, J., and Zhou, C. Z. (2007). Crystal structure of glutathione reductase Glr1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 68(4), 972-979.
- Zaki, O., Weekers, F., Thonart, P., Tesch, E., Kuenemann, P., and Jacques, P. (2020).

Limiting factors of mycopesticide development. *Biological Control*, 104220.

- Zechmann, B. (2020). Subcellular roles of glutathione in mediating plant defense during biotic stress. *Plants*, 9(9), 1067.
- Zerroug, A., Belaidi, S., BenBrahim, I., Sinha, L., and Chtita, S. (2019). Virtual screening in drug-likeness and structure/activity relationship of pyridazine derivatives as Anti-Alzheimer drugs. *Journal of King Saud University-Science*, 31(4), 595-601.
- Zhang, B., Wu, X., Tai, X., Sun, L., Wu, M., Zhang, W., Chen, X., Zhang, G., Chen, T., Liu, G., and Dyson, P. (2019). Variation in actinobacterial community composition and potential function in different soil ecosystems belonging to the arid Heihe River Basin of Northwest China. *Frontiers in microbiology*, 2209.
- Zhang, L. I., and Skolnick, J. (1998). What should the Z-score of native protein structures be? *Protein science*, 7(5), 1201-1207.
- Zhang, S., Yan, Z., Huang, Y., Liu, L., He, D., Wang, W., Fang, X., Zhang, X., Wang, F., Wu, H., and Wang, H. (2022). HelixADMET: a robust and endpoint extensible ADMET system incorporating self-supervised knowledge transfer. *arXiv preprint arXiv:2205.08055*.
- Zhang, Z., Chen, Y., Li, B., Chen, T., and Tian, S. (2020). Reactive oxygen species: A generalist in regulating development and pathogenicity of phytopathogenic fungi. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3344-3349.
- Zhao, J., Xue, Q. H., Niu, G. G., Xue, L., Shen, G. H., and Du, J. Z. (2013). Extracellular enzyme production and fungal mycelia degradation of antagonistic *Streptomyces* induced by fungal mycelia preparation of cucurbit plant pathogens. *Annals of microbiology*, 63(2), 809-812.
- Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends in immunology*, 35(7), 345-351.
- Živković, S., Stojanović, S., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Popović, T., and Balaž, J. (2010). Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Archives of Biological Sciences*, 62(3), 611-623.
- Zoete, V., Grosdidier, A., and Michielin, O. (2009). Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design. *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(2), 238-248.

- **Site web 1** : La production de la tomate transformée à près de 8 millions de quintaux en 2018 <http://www.aps.dz/economie/83875-la-production-de-la-tomate-transformee-a-pres-de-8-millions-de-quintaux-en-2018>

Site web 2 : Tomate : une production 14 millions de quintaux est prévue cette année <https://www.algerie-eco.com/2018/09/21/tomate-une-production-14-millions-de-quintaux-est-prevue-cette-annee/>.

- **site web3**: <https://moisissures.wixsite.com/tpemoisissures/blank-c13ay>.

- **site web4**: <http://www.expertsmind.com/topic/reproduction-in-fungi/reproduction-in-the-chytridiomycota-92582.aspx>.

- **Sit web5**: <https://wou.edu/chemistry/courses/online-chemistry-textbooks/ch450-and-ch451-biochemistry-defining-life-at-the-molecular-level/chapter-2-protein-structure>

Annexes

Annexe 1

1. Milieux de culture

- **PDA :**
 - Glucose 20 g
 - Extrait de pomme de terre 200 g
 - Agar 20 g
 - Eau distillée 1000ml
- **Sabouraud**
 - Peptone 10 g
 - Glucose 40 g
 - Agar 15g
 - Eau distillée 1000ml
 - PH 5.6
- **Milieu ISP2**
 - Extrait de levure 4 g
 - Extrait de malt 10 g
 - Glucose 4 g
 - Agar 20 g
 - Eau distillée 1000ml
 - PH 7,2
- **Milieu ISP3**
 - Farine d'avoine : 20 g.
 - Solution saline standard : 1 ml.
 - Agar : 20 g.
 - Eau distillée :1000 ml.
 - PH=7.2
- **Milieu ISP4**
 - Amidon: 10 g.
 - K₂HPO₄: 1 g.
 - MgSO₄, 7H₂O: 1 g.
 - NaCl: 1 g. (NH₄)₂SO₄: 2 g.
 - CaCO₃ : 2 g.
 - Agar : 20 g.
 - Eau distillée : 1000 ml.
 - PH= 7.2
- **Milieu ISP5**
 - Glycérol 10g
 - L-Asparagine 1g
 - K₂HPO₄ 1g
 - Solution saline 1ml
 - Eau distillée 1000ml
 - Agar 20g
 - PH= 7.4
- **Milieu ISP7**
 - Glycérol :15g
 - Tyrosine :0.5g
 - Asparagine :1g

- KH₂PO₄ :0.5g
- MgSO₄, 7H₂O :0.5g
- Na Cl :0.5g
- FeSO₄ 7H₂O :0.01g
- Solution saline standard :1ml
- Agar :20g
- Eau distillée :1000ml
PH =7.2
- **Milieu Bennet**
 - Agar : 15g
 - Extraits de levure : 2g
 - Extraits de viande : 1g
 - Peptone : 2g
 - Glucose : 10g
PH=7.3
- **Solution saline standard**
 - FeSO₄, 7H₂O 0.1 g
 - MnCl₂, 4H₂O 0.1 g
 - ZnSO₄, 7H₂O 0.1 g
 - Eau distillée 1000 ml
- 2. **Milieux de la mise en évidence des activités enzymatiques**
 - **Protéase**
 - Extrait de viande 3g
 - Peptone 10g
 - NaCl 10g
 - Lait écrémé 100ml
 - Agar20g
 - Eau distillée 1000 ml
 - **Cellulase**
 - Carboxyméthylcellulose (CMC) 10g
 - MgSO₄ 0.2g
 - NaCl 0.1g
 - Extrait de levure 4g
 - KH₂PO₄ 0.4g
 - Agar 20g
 - Eau distillée 1000 ml
 - **Amylase**
 - Peptone 5 g
 - Levure 3 g
 - NaCl 5 g
 - Amidon 2 g
 - Agar 20g
 - Eau distillée 1000 ml
 - **Pectinase**
 - Pectine 5g
 - Extrait de levure 1g
 - Agar 15g
 - Eau distillée 1000 ml

- **Lipase**
 - Peptone 10g
 - NaCl 5g
 - CaCl₂ 0.1g
 - Agar 20g
 - Tween 80 10 ml
 - Eau distillée 1000 ml
- **Estérase**
 - Peptone 10g
 - NaCl 5g
 - CaCl₂ 0.1g
 - Agar 20g
 - Tween 20 10 ml
 - Eau distillée 1000 ml
- **Chitinase**
 - MgSO₄.7H₂O 0.3g
 - (NH₄)₂SO₄ 3g
 - KH₂PO₄, 2g
 - Acide citrique 1g
 - Agar 15g
 - Tween-80 200 µl
 - Chitine colloïdal 4.5g
 - Pourpre de bromocrésol 0.15g
 - PH = 4,7
- **Laccase**
 - Gélose nutritive
 - 2-6 dimethoxyphénol (DMP) 0.4%

Annexe2

Tableau 1. Molécules bioactives produites par les moisissures

Molécules	Smile canonique	Producteur
altersolanol A	<chem>CC1(C(C(C2=C(C1O)C(=O)C3=C(C2=O)C(=C(C=C3)OC)O)O)O)O</chem>	<i>Ampelomyces</i> sp.
Acide Helvolique	<chem>CC1C2C(C(=O)C3(C(C2(C=CC1=O)C)CCC4C3(CC(C4=C(CCC=C(C)C)C(=O)O)OC(=O)C)C)OC(=O)C</chem>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Acetoxyverruculogen	<chem>CC(=CC1N2C3=C(C=CC(=C3)OC)C4=C2C(C(C(OO1)(C)C)N5C(=O)C6CC(CN6C(=O)C5(C4O)O)OC(=O)C)C</chem>	<i>Penicillium brasilianum</i>
Acremoxanthone	<chem>CC1=CC2=C(C(=C1)O)C(=O)C3(C(=O)C4C=C(C3(C2O)CC5=CC6=C(C(=C45)O)C(=O)C7=C(O6)C=CC(=C7C(=O)OC)O)O</chem>	<i>Verticillium</i> sp.
Apicidin	<chem>CCC(C)C1C(=O)N2CCCCC2C(=O)NC(C(=O)NC(C(=O)N1)CC3=CN(C4=CC=CC=C43)OC)CCCCC(=O)CC</chem>	<i>Fusarium</i> sp.
Asperamide	<chem>CCCCCCCCCCCC=CC(C(=O)NC(COC1C(C(C(C(O1)CO)O)O)O)C(C=CCCC=C(C)CCCCCCCC)O)O</chem>	<i>Aspergillus niger</i>
Aspergiolide	<chem>CC1=CC(=C2C3=C1OC(=O)C4=C3C5=C(C2=O)C(=CC(=C5C6(C4=O)C(=CC7=C(C6=O)C(=CC(=C7)O)O)C)O)O)O</chem>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Aspernigrin	<chem>C[C@@H](CC(=O)NC(=O)C1=CN(C(=CC1=O)CC2=CC=CC=C2)[C@@H](CC3=CC=CC=C3)C4=CC(=CC(=O)O4)OC)C(=O)O</chem>	<i>Aspergillus niger</i>
Asperphenamate	<chem>C1=CC=C(C=C1)CC(COC(=O)C(CC2=CC=CC=C2)NC(=O)C3=CC=CC=C3)NC(=O)C4=CC=CC=C4</chem>	<i>Penicillium spathulatum</i>
Asperazine	<chem>C1C2C(=O)NC(C(=O)N2C3C1(C4=CC=CC=C4N3)C5=CC=CC6=C5NC=C6CC7C(=O)NC(C(=O)N7)CC8=CC=CC=C8)CC9=CC=CC=C9</chem>	<i>Aspergillus niger</i>
astaxanthin	<chem>CC1=C(C(CC(C1=O)O)(C)C)C=CC(=CC=CC(=CC=CC=C(C)C=CC=C(C)C=CC2=C(C(=O)C(CC2(C)C)O)C)C</chem>	<i>Aspergillus melleus</i>
Aurasperone	<chem>CC1=CC(=O)C2=C(O1)C=C3C=C(C(=C(C3=C2O)OC)C4=C5C(=C(C6=C4C=C(C=C6OC)OC)O)C(=O)C=C(O5)C)OC</chem>	<i>Aspergillus carbonarius</i>
Bassianin	<chem>CCC(C)C=C(C)C=CC=CC(=O)C1=C(C(=CN(C1=O)O)C2=CC=C(C=C2)O)O</chem>	<i>Beauveria bassiana</i>
Bulnesene	<chem>CC1CCC2=C(CCC(CC12)C(C)C)C</chem>	<i>Muscodor albus</i>
Calbistrin	<chem>CC1CC(C2C(=C1)C=CC3(C2(C(=O)CC(O3)O)C)C)OC(=O)C(C)C(C(=CC=CC(=CC=CC(=O)O)C)C)O</chem>	<i>Aspergillus</i> sp., <i>versicolor</i> sp., <i>Penicillium restrictum</i>
Camptothecin	<chem>CCC1(C2=C(COC1=O)C(=O)N3CC4=CC5=CC=CC=C5N=C4C3=C2)O</chem>	<i>Fusarium solani</i>

	<chem>4=CC=CC=C4)NC(=O)C5CN(C6CC7=CNC8=CC=CC(=C78)C6=C5)C</chem>	
Ferriaspergillin	<chem>CCC(C)C1=CN=C(C(=O)N1[O-])CC(C)C.CCC(C)C1=CN=C(C(=O)N1[O-])CC(C)C.CCC(C)C1=CN=C(C(=O)N1[O-])CC(C)C.[Fe+3]</chem>	<i>Aspergillus flavus</i>
Fonsecinone	<chem>CC1=CC(=O)C2=C(C=C3C=C(C(=C(C3=C2O1)OC)C4=C5C(=C(C6=C4C=C(C=C6OC)OC)O)C(=O)C=C(O5)C)OC)O</chem>	<i>Aspergillus niger</i>
Fumigatoside	<chem>CC1C2=NC3=CC=CC=C3C(=O)N2C(C(=O)N1)CC4(C5N(C(C(=O)N5C6=CC=CC=C64)C)C7C(C(C(C(O7)CO)O)O)O)O</chem>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Fumagillin	<chem>CC(=CCC1C(O1)(C)C2C(C(CCC23CO3)OC(=O)C=CC=CC=CC(=O)O)OC)C</chem>	<i>Aspergillus sp.</i>
Fumiquinazoline	<chem>CC(=O)N1C2C(C3=CC=CC=C3N2C(=O)C14C4)(CC5C(=O)N(C(=C)C6=NC7=CC=CC=C7C(=O)N56)C)O</chem>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
fumitremorgen	<chem>CC(=CCOC1C2=C3C(CC(OOC(N3C4=C2C=C(C(=C4)OC)C=C(C)C)(C)C)N5C1(C(=O)N6CC6C5=O)O)C</chem>	<i>Aspergillus caespitosus</i>
Fumonisin	<chem>CCCCC(C)C(C(CC(C)CC(CCCCC(C(C(C)N)O)O)O)OC(=O)CC(CC(=O)O)C(=O)O)OC(=O)CC(CC(=O)O)C(=O)O</chem>	<i>Fusarium sp.</i>
Acide Fusidique	<chem>CC1C2CCC3(C(C2(CCC1O)C)C(CC4C3(CC(C4=C(CCC=C(C)C)C(=O)O)OC(=O)C)O)C</chem>	<i>Acremonium fusidioides</i>
Fusapyrone	<chem>CCCCCCC(C)CC(=CC(CO)C=C(C)C=CC(C(C)C)C1=CC(=C(C(=O)O1)C2C(C(CC(O2)CO)O)O)O)C</chem>	<i>Fusarium sp.</i>
Gibberellins	<chem>CC12C(C=CC3(C1C(C45C3CCC(C4)(C(=C)C5)O)C(=O)O)OC2=O)O</chem>	<i>Aspergillus niger</i>
Acide Gibberellique	<chem>CC12C(C=CC3(C1C(C45C3CCC(C4)(C(=C)C5)O)C(=O)O)OC2=O)O</chem>	<i>Fusarium fujikuroi</i>
Gliocladine	<chem>CC12C(=O)N3C4C(C(C3(C(=O)N1C)SS2)O)(C5=CC=CC=C5N4)C67C(C89C(=O)N(C(C(=O)N8C6NC1=CC=CC=C71)(SSSS9)C)C)O</chem>	<i>Clonostachys rosea</i>
Griseofulvin	<chem>CC1CC(=O)C=C(C12C(=O)C3=C(O2)C(=C(C=C3OC)OC)Cl)OC</chem>	<i>Penicillium sp.</i>
Harzianolide	<chem>CC=CC=CCC1=C(C(=O)OC1)CC(C)O</chem>	<i>Trichoderma harzianum</i>
Acide helvolique	<chem>CC1C2C(C(=O)C3(C(C2(C=CC1=O)C)CCC4C3(CC(C4=C(CCC=C(C)C)C(=O)O)OC(=O)C)C)OC(=O)C</chem>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Acide heptelidique	<chem>CC(C)C1CCC2(CO2)C3C1C=C(COC3=O)C(=O)O</chem>	<i>Trichoderma viride</i>
Hexadehydroastechrome	<chem>CC1=NC(=C(N(C1=[OH+])O)CC2=CNC3=C(C=CC=C23)C=CC(=C)C)OC.CC1=NC(=C(N(C1=[OH+])O)CC2=CNC3=C(C=CC=C23)C=CC(=C)C)OC.CC1=NC(=C(N(C1=[OH+])O)CC2=C</chem>	<i>Aspergillus fumigatus</i>

	<chem>NC3=C(C=CC=C23)C=CC(=C)C)OC.[Fe]</chem>	
Huperzine A	<chem>CC=C1C2CC3=C(C1(CC(=C2)C)N)C=CC(=O)N3</chem>	<i>Acremonium sp.</i> <i>Botrytis sp.</i>
Hypericin	<chem>CC1=CC(=O)C2=C(C3=C(C=C(C4=C3C5=C2C1=C6C(=CC(=O)C7=C(C8=C(C=C(C4=C8C5=C67)O)O)C)O)O)O</chem>	<i>Chaetomium globosum</i>
Javanicin	<chem>CC1=C(C(=C2C(=C1O)C(=O)C=C(C2=O)OC)O)CC(=O)C</chem>	<i>Fusarium javanicum</i>
Acide Kojique	<chem>C1=C(OC=C(C1=O)O)CO</chem>	<i>Aspergillus oryzae</i>
Lovastatine	<chem>CCC(C)C(=O)OC1CC(C=C2C1C(C(C=C2)C)C)CC3CC(CC(=O)O3)O)C</chem>	<i>Aspergillus terreus</i>
Malformin	<chem>CCC(C)C1C(=O)NC2CSSCC(C(=O)NC(C(=O)NC(C(=O)N1)CC(C)C)C(C)C)NC2=O</chem>	<i>Aspergillus niger</i>
8-O-methylaverufin	<chem>CC12CCCC(O1)C3=C(O2)C=C4C(=C3O)C(=O)C5=C(C4=O)C=C(C=C5OC)O</chem>	<i>Penicillium sp.</i>
6-O methyl alaternin	<chem>CC1=CC2=C(C(=C1O)O)C(=O)C3=C(C2=O)C=C(C=C3O)OC</chem>	<i>Ampelomyces sp</i>
8-O-méthylsclererotiorinamine	<chem>CCC(C)C=C(C)C=CC1=CC2=C(C(=O)C(C(=C2C=N1)OC)(C)OC(=O)C)Cl</chem>	<i>Penicillium sp.</i>
Mevinlon	<chem>CCC(C)C(=O)OC1CC(C=C2C1C(C(C=C2)C)C)CC3CC(CC(=O)O3)O)C</chem>	<i>Aspergillus terreus</i>
Miyakamide	<chem>CC(=O)NC(CC1=CC=C(C=C1)O)C(=O)N(C)C(CC2=CC=CC=C2)C(=O)NC=CC3=CNC4=CC=CC=C43</chem>	<i>Aspergillus flavus</i>
Mizoribine	<chem>C1=NC(=C(N1C2C(C(C(O2)CO)O)O)O)C(=O)N</chem>	<i>Penicillium brefeldianum</i>
Monascorubramine	<chem>CCCCCCCC(=O)C1=C2C=C3C=C(N(C=C3C(=O)C2(OC1=O)C)C(CCC(=O)O)C(=O)O)C=C</chem>	<i>Monascus sp.</i>
Mulundocandin	<chem>CCC(C)CCCCCCCCC(=O)NC1CC(C(NC(=O)C2C(C(CN2C(=O)C(NC(=O)C(NC(=O)C3C(C(CN3C(=O)C(NC1=O)C(C)O)O)C(C(C4=CC=C(C=C4)O)O)O)CO)C)O)O)O</chem>	<i>Aspergillus mulundensis</i>
Acide mycophenolique	<chem>CC1=C2COC(=O)C2=C(C(=C1OC)C/C=C(\C)/CCC(=O)O)O</chem>	<i>Penicillium sp.</i>
Nigerasperone A	<chem>CC1=CC(=C(C(=C1)C2=CC(=CC(=O)O2)OC)C3=CC=CC=C3)C</chem>	<i>Aspergillus niger</i>
Penicillin V	<chem>CC1(C(N2C(S1)C(C2=O)NC(=O)COC3=CC=C(C=C3)C(=O)O)C</chem>	<i>Penicillium sp.</i>
Penicisteroid	<chem>CC(C)C(C)C=CC(C)C1C(CC2C1(CC(C3C2C(C(C4(C3(CCC(C4)O)C)O)O)O)O)C)OC(=O)C</chem>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Peptaibol	<chem>CCC(C)C(C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(C)(C)C(=O)N1CCCC1C(=O)NC(CO)C(C)C)NC(=O)C2CCCN2C(=O)C(C)(C)NC(=O)C(C(C)C)NC(=O)C(C(C)CC)NC(=O)C(CCC(=O)N)NC(=O)C(C)(C)NC(=O)C</chem>	<i>Clonostachys rosea</i>

Pestalachloride	<chem>CC1=C(C(=C(C(=C1Cl)OC)C2C3=C(C(=CC(=C3C(=O)N2)O)O)CC=C(C)C)O)Cl</chem>	<i>Pestalotiopsis</i> sp. <i>Pestalotiopsis adusta</i>
phenylethyl alcool,	<chem>C1=CC=C(C=C1)CCO</chem>	<i>Muscodor albus</i>
2- phenylethyl ester,	<chem>CC=CC(=O)OCC1=CC=CC=C1</chem>	<i>Muscodor albus</i>
Phomopsichalasin	<chem>CC1CCC2C3C(C(=CC2(C1)C)C)C4(C=C(C(C5C4(C3=O)C(=O)NC5(CC6=CC=C(C=C6)O)O)C)C)C</chem>	<i>Phomopsis</i> sp.
p-hydroxybenzaldehyde	<chem>C1=CC(=CC=C1C=O)O</chem>	<i>Aspergillus similanensis</i>
pneumocandin	<chem>CC1CN2C(C1O)C(=O)NC(C(CC(C(=O)NC(C(=O)N3CC(CC3C(=O)NC(C(=O)NC(C2=O)C(C(=O)N)O)C(C(C4=CC(=C(C=C4)O)OS(=O)(=O)O)O)O)C(C)O)N)O)O</chem>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Podophyllotoxin	<chem>COC1=CC(=CC(=C1OC)OC)C2C3C(COC3=O)C(C4=CC5=C(C=C24)OCO5)O</chem>	<i>Phialocephala fortinii</i>
Pravastatin	<chem>CCC(C)C(=O)OC1CC(C=C2C1C(C(C=C2)C)CC(CC(CC(=O)O)O)O)O</chem>	<i>Aspergillus</i> sp.
Acide propanoique,	<chem>CCC(=O)O</chem>	<i>Muscodor crispans</i>
Pyripyropene	<chem>CC(=O)OCC1(C(CCC2(C1CC(C3(C2C(C4=C(O3)C=C(OC4=O)C5=CN=CC=C5)O)C)OC(=O)C)C)OC(=O)C)C</chem>	<i>Aspergillus lentulus</i>
Radicicol	<chem>CC1CC2C(O2)C=CC=CC(=O)CC3=C(C(=CC(=C3Cl)O)O)C(=O)O1</chem>	<i>Chaetomium chiversii</i>
Resveratrol	<chem>C1=CC(=CC=C1C=CC2=CC(=CC(=C2)O)O)O</chem>	<i>Aspergillus niger</i>
Acide Secalonique	<chem>CC1CC(=O)C2=C(C3=C(C=CC(=C3O)C4=C(C5=C(C=C4)OC6(C(C(CC(=O)C6=C5O)C)O)C(=O)OC)O)OC2(C1O)C(=O)OC)O</chem>	<i>Aspergillus aculeatus</i>
Sordacirin	<chem>CC1CCC2C1CC3(C4CC2(C3(C(=C4)C(C)C)C(=O)O)C=O)CO</chem>	<i>Moississure Endophytique</i>
Spirotryprostatin	<chem>CC(=CC1C2(C(C3(N1C(=O)C4CCCN4C3=O)O)O)C5=C(C=C(C=C5)OC)N(C2=O)C=CC(C)(C)OO)C</chem>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Sulpinine	<chem>CC(=C)C1C(C2C3(O2)C(O1)CCC4(C3(CCC5C4(C(=O)NC6=C(C=CC(=C6)C(C)(C)C=C)C(=O)C5)C)O)C)O</chem>	<i>Aspergillus sulphureus</i>
Sydowinin A	<chem>COC(=O)C1=C2C(=CC=C1)OC3=CC(=CC(=C3C2=O)O)CO</chem>	<i>Aspergillus sydowii</i>
Taxol	<chem>CC1=C2C(C(=O)C3(C(CC4C(C3C(C(C2(C)C)CC1OC(=O)C(C(C5=CC=CC=C5)NC(=O)C6=CC=CC=C6)O)O)OC(=O)C7=CC=CC=C7)(CO4)OC(=O)C)O)C)OC(=O)C</chem>	<i>Taxomyces andreanae</i>
Tenellin	<chem>CCC(C)C=C(C)C=CC(=O)C1=C(C(=CN(C1=O)O)C2=CC=C(C=C2)O)O</chem>	<i>Beauveria bassiana</i>
Terpenoid	<chem>CC12CCC(CC1C(CC(C2)O)(C)O)C(C)(C)OC3C(C(C(C(O3)CO)O)O)O</chem>	<i>Phomopsis</i> sp.
Tryptoquivaline	<chem>CC(C)C(C1=NC2=CC=CC=C2C(=O)N1C3CC4(C5N(C6=CC=CC=C64)C(=O)C(N5O)(C)C)OC</chem>	<i>Aspergillus fumigatus</i>

Anthraquinones	<chem>C1CC2C=CC1C3C2C(=O)C4=C(C=CC(=C4C3=O)O)O</chem>	<i>Streptomyces</i> sp.
Antimycin	<chem>CC1C(OC=C2C1=C(C(=C(C2=O)C(=O)O)O)C)C</chem>	<i>Streptomyces</i> sp.
Arenamide a	<chem>CCCCC(C)C1CC(=O)NCC(=O)NC(C(=O)NC(C(=O)NC(C(=O)O)1)CC2=CC=CC=C2)C)CC(C)C)C(C)C</chem>	<i>Streptomyces</i> sp.
Asterobactin	<chem>CCCCCCCCC(C(C)C(=O)NC(CCCN(C(=N)N)O)C(=O)NO)OC(=O)C(CCCN(C(=O)O)NC(=O)C(COC(=O)C1=CC=CC=C1O)O</chem>	<i>Nocardia asteroides</i>
Avermectin	<chem>CCC(C)C1C(C=CC2(O)CC3CC(O)CC=C(C(C(C=CC=C4COC5C4(C(C=C(C5O)C)C(=O)O3)O)C)OC6CC(C(C(O6)C)OC7CC(C(C(O7)C)O)OC)OC)C)C</chem>	<i>Streptomyces avermitilis</i>
Avermectin	<chem>CCC(C)C1C(C=CC2(O)CC3CC(O)CC=C(C(C(C=CC=C4COC5C4(C(C=C(C5O)C)C(=O)O3)O)C)OC6CC(C(C(O6)C)OC7CC(C(C(O7)C)N)C)OC)OC)C.C1=CC=C(C=C1)C(=O)O</chem>	<i>Streptomyces avermitilis</i>
Azalomycin	<chem>CCC1(CC(C2(CCC(C3(C2C(=O)CC3)C(C1O)C)C)C)OC(=O)CSC4=NNC(=N4)N)C</chem>	<i>Streptomyces</i> sp.
Bafilomycin	<chem>CC1CC(=CC=CC(C(OC(=O)C(=CC(=CC(C1O)C)C)OC)C(C)C(C(C)C2(CC(C(C(O2)C(C)C)C)O)O)O)OC)C</chem>	<i>Streptomyces cavourensis</i>
Bambermycin	<chem>CC1C(C(C(C(O1)OC2C(OC(C(C2O)NC(=O)C)OC3C(C(C(OC3OP(=O)(O)OCC(C(=O)OCCC=C(C)CCC=CC(C)(C)CCC(=C)CC=C(C)CCC=C(C)C)O)C(=O)O)(C)O)OC(=O)N)COC4C(C(C(C(O4)CO)O)O)NC(=O)C)O)OC5C(C(C(C(O5)C(=O)NC6=C(CCC6=O)O)O)O)O</chem>	<i>Streptomyces bambergiensis</i>
Bestatin	<chem>CC(C)CC(C(=O)O)NC(=O)C(C(CC1=CC=CC=C1)N)O</chem>	<i>Streptomyces olivoreticul</i>
Biphenomycin	<chem>C1C(C(=O)NC(C(=O)NC(C(C2=C(C=CC(=C2)C3=CC1=C(C=C3)O)O)O)C(=O)NC(CCCN=C(N)N)C(=O)NC(CO)C(=O)O)CC(CN)O)N</chem>	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i> 43708
Blasticidin	<chem>CN(CCC(CC(=O)NC1C=CC(OC1C(=O)O)N2C=CC(=NC2=O)N)N)C(=N)N.Cl</chem>	<i>Streptoverticillium</i> sp.
Bleomycin	<chem>CC1=C(N=C(N=C1N)C(CC(=O)N)NCC(C(=O)N)N)C(=O)NC(C(C2=CN=CN2)OC3C(C(C(C(O3)CO)O)O)OC4C(C(C(C(O4)CO)O)OC(=O)N)O)C(=O)NC(C)C(C(C)C(=O)NC(C(C)O)C(=O)NCCC5=NC(=CS5)C6=NC(=CS6)C(=O)NCCC[S+](C)C)O</chem>	<i>Streptomyces verticillus</i>
Boromycin	<chem>[B-]123OC4C(=O)OC(CC=CCCC(C(C5CCC(C(O1)(O5)C(O2)C(=O)OC6CC(CCCC(C(C7CCC(C4(O3)O7)C)(C)C)O)OC6C)C)(C)C)O)C(C)OC(=O)C(C(C)C)[NH3+]</chem>	<i>Streptomyces antibioticus</i>
Borrelidine	<chem>CC1CC(CC(C(C(=CC=CCC(OC(=O)CC(C(C1)</chem>	<i>Streptomyces</i>

)C)O)N)O	
Dekamycin	CCCCCCCCC=CCCCCCCCC(=O)O.C1C(C(C(C(C1N)OC2C(C(C(C(O2)CN)O)O)N)OC3C(C(C(O3)CO)OC4C(C(C(C(O4)CN)O)O)N)O)O)N	<i>Streptomyces fradiae</i>
Demethylnovobiocin	CC(=CCC1=C(C=CC(=C1)C(=O)NC2=C(C3=C(C=C(C=C3)OC4C(C(C(C(O4)(C)C)OC)OC(=O)N)O)OC2=O)O)O)C	<i>Streptomyces</i> sp.
Dentigerumycin	CCCC1CCC(OC1CC)(C(C)(C(=O)NC2C(OC(=O)C(NC(=O)C3CC(CNN3C(=O)C4CCCN4C(=O)C(N(C(=O)C5CCCN5C2=O)O)C)O)C(C)C)O)O	<i>Streptomyces albogriseolus</i>
Desferrioxamine	CC(=O)N(CCCCCNC(=O)CCC(=O)N(CCCCCNC(=O)CCC(=O)N(CCCCCN)O)O)O	<i>Streptomyces griseus</i>
Diazepinomicin	CC(=CCCC(=CCCC(=CCN1C2=C(C(=CC(=C2)O)O)NC3=C(C1=O)C=CC=C3O)C)C)C	<i>Micromonospora</i> sp.
Dihydrogranaticin	CC1C(CCC(O1)OC2CC3C4=C(C2(C(O3)C)O)C(=C5C(=C4O)C(=O)C6=C(C5=O)C(OC(C6)C(=O)O)C)O)O	<i>Streptomyces</i> sp.
Doxorubicin (adriamycin)	CC1C(C(CC(O1)OC2CC(CC3=C2C(=C4C(=C3)O)C(=O)C5=C(C4=O)C(=CC=C5)OC)O)(C(=O)CO)O)N)O	<i>Streptomyces peucetius</i>
Erythromycin	CCC1C(C(C(C(=O)C(CC(C(C(C(C(C(=O)O1)C)OC2CC(C(C(O2)C)O)(C)OC)C)OC3C(C(CC(O3)C)N(C)C)O)(C)O)C)C)O)(C)O	<i>Streptomyces erythraeus</i>
Fungichromin	CCCCC(C1C(CC(CC(CC(CC(C(C(C(=CC=CC=CC=CC(C(OC1=O)C)O)C)O)O)O)O)O)O)O)O	<i>Streptomyces padanus</i>
Galbonolides	CCC1C(=CC(=C)CC(C=C(CC(C(=O)C(C(=O)O1)C)(CO)O)OC)C)C	<i>Micromonospora</i> sp.
Gentamicin	CC(C1CCC(C(O1)OC2C(CC(C(C2O)OC3C(C(C(CO3)(C)O)NC)O)N)N)N)NC	<i>Streptomyces</i> sp.
Griseusin	CC1CC(C(C2(O1)C3=C(C4C(O2)CC(=O)O4)C(=O)C5=C(C3=O)C(=CC=C5)O)OC6CCC(C(O6)C)N(C)C)OC(=O)C	<i>Nocardiosis</i> sp.
Herbimycin	CC1CC(C(C(C=C(C(C(C=CC=C(C(=O)NC2=C(C(=O)C=C(C1OC)C2=O)C)OC)OC(=O)N)C)C)OC)OC	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>
8-hydroxyquinoline	C1=CC2=C(C(=C1)O)N=CC=C2	<i>Streptomyces</i> sp.
Hygromycin	CC(=CC1=CC(=C(C=C1)OC2C(C(C(O2)C(=O)C)O)O)O)C(=O)NC3C(C(C4C(C3O)OCO4)O)O	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>
Acide Indole-3-carboxylique	C1=CC=C2C(=C1)C(=CN2)C(=O)O	<i>Streptomyces</i> sp.
Jadomycin	CCC(C)C1C(=O)OC2N1C3=C(C4=C2C=C(C=C4O)C)C(=O)C5=C(C3=O)C(=CC=C5)O	<i>Streptomyces venezuelae</i>

Josamycin	<chem>CC1CC=CC=CC(C(CC(C(C(C(CC(=O)O1)OC(=O)C)OC)OC2C(C(C(C(O2)C)OC3CC(C(C(O3)C)OC(=O)CC(C)C)(C)O)N(C)C)O)CC=O)C)O</chem>	<i>Streptomyces narbonensis</i>
Kanamycin	<chem>C1C(C(C(C(C1N)OC2C(C(C(C(O2)CN)O)O)O)OC3C(C(C(C(O3)CO)O)N)O)N</chem>	<i>Streptomyces knanamyceticus</i>
Kasugamycin	<chem>CC1C(CC(C(O1)OC2C(C(C(C(C2O)O)O)O)O)N)N=C(C(=O)O)N</chem>	<i>Streptomyces kasugaensis</i>
Keyicin	<chem>CC1C(C(CC(O1)OC2C(OC(CC2(C)[N+](=O)[O-])OC3C(OC(CC3O)OC4C(OC(CC4N(C)C)OC5CC(C(C6=CC7=C(C(=C56)O)C(=O)C8=C(C=C9C(=C8C7=O)OC1C(C(C(C9(O1)C)OC1CC(C(C(O1)C)OC1CC(C(C(O1)C)OC1CC(C(C(O1)C)O)O)(C)[N+](=O)[O-])O)N(C)C)O)O)C(=O)OC)(C)O)C)C)O)O</chem>	<i>Micromonospora sp.</i>
Kifunensine	<chem>C(C1C(C(C(C2N1C(=O)C(=O)N2)O)O)O)O</chem>	<i>Kitasatospora sp.</i>
Kirromycin	<chem>CCC(C(=O)NCC=CC=C(C)C(C(C)C1C(C(C(O1)C=CC=CC=C(C)C(=O)C2=C(C=CNC2=O)O)O)OC)C3(C(C(C(C(O3)C=CC=CC)(C)C)O)O)O</chem>	<i>Streptomyces collinus</i>
Kitamycin	<chem>CCCCCC1C(C(OC(=O)C(C(OC1=O)C)NC(=O)C2=C(C(=CC=C2)NC=O)O)C)O</chem>	<i>Streptomyces sp.</i>
Lactonamycin	<chem>CC1C(CCC(O1)OC23COC4(C2(C(=O)C5=C(C3=O)C=C6C=C(C7=C(C6=C5O)CN(C7=O)C)O)OC(=O)C4)OC)O</chem>	<i>Streptomyces sp.</i>
Lincomycin	<chem>CCCC1CC(N(C1)C)C(=O)NC(C2C(C(C(C(O2)SC)O)O)O)C(C)O</chem>	<i>Streptomyces lincolensis</i>
Lobophorin	<chem>CC1CC(C(C2C1C3(C(C=C2)C(=CCC(C(=CC4C=C(C(C(C45C(=O)C(=C3O)C(=O)O5)C)C)C)OC6CC(C(C(O6)C)NC(=O)OC)(C)[N+](=O)[O-])C)C)OC7CC(C(C(O7)C)O)OC8CC(C(C(O8)C)O)O)C</chem>	<i>Streptomyces sp.</i>
Lomofungin	<chem>COC(=O)C1=C2C(=NC3=C(N2)C(=O)C=C(C3=CO)O)C(=O)C=C1</chem>	<i>Streptomyces lomondensis</i>
Lupinacidin	<chem>CC1=C(C(=C2C(=C1O)C(=O)C3=C(C2=O)C(=CC=C3)O)CCC(C)C)O</chem>	<i>Micromonospora lupini</i>
Maklamicin	<chem>CC1CCC2C(C1)C=CC3C2(C(=C4C(=O)C5(CC(C(=CC5(CC=CC3C)C)CO)CC(C)O)OC4=O)O)C</chem>	<i>Micromonospora sp.</i>
Manumycin	<chem>CCCC(C)C=C(C)C=C(C)C(=O)NC1=CC(C2C(C1=O)O2)(C=CC=CC=CC(=O)NC3=C(CCC3=O)O)O</chem>	<i>Streptomyces parvulus</i>
Mechercharmycin	<chem>CCC(C)C(C(=O)NC(C(C)C)C(=O)NC(=C)C1=NC(=CO1)C2=NC(=CO2)C(=O)N)NC(=O)C3=C(OC(=N3)C4=COC(=N4)C(=O)OC)C5=CC=C C=C5</chem>	<i>Thermoactinomyces sp.</i>
Midecamycin	<chem>CCC(=O)OC1CC(=O)OC(CC=CC=CC(C(C(C</chem>	<i>Streptomyces</i>

	<chem>(C1OC)OC2C(C(C(C(O2)C)OC3CC(C(C(O3)C)OC(=O)CC)(C)O)N(C)C)O)CC(=O)C)O)C</chem>	<i>mycarofaciens</i>
Neomycin	<chem>C1C(C(C(C(C1N)OC2C(C(C(C(O2)CN)O)O)N)OC3C(C(C(O3)CO)OC4C(C(C(C(O4)CN)O)O)N)O)O)N</chem>	<i>Streptomyces fradiae</i>
Nikkomycin	<chem>CC(C(C1=NC=C(C=C1)O)O)C(C(=O)NC(C2C(C(C(O2)N3C=CC(=O)NC3=O)O)O)C(=O)O)N</chem>	<i>Streptomyces tendae</i>
Nistatin	<chem>CC1C=CC=CCCC=CC=CC=CC=CC(CC2C(C(CC(O2)(CC(C(CCC(CC(CC(CC(=O)OC(C(C1O)C)C)O)O)O)O)O)O)C(=O)O)OC3C(C(C(C(O3)C)O)N)O</chem>	<i>Streptomyces noursei</i>
Novobiocin	<chem>CC1=C(C=CC2=C1OC(=O)C(=C2O)NC(=O)C3=CC(=C(C=C3)O)CC=C(C)C)OC4C(C(C(C(O4)C)C)OC)OC(=O)N)O</chem>	<i>Streptomyces niveus</i>
Oleandomycin	<chem>CC1CC(C(C(O1)OC2C(CC3(CO3)C(=O)C(C(C(C(OC(=O)C(C(C2C)OC4CC(C(C(O4)C)O)OC)C)C)O)C)C)O)N(C)C</chem>	<i>Streptomyces antibioticus</i>
Oxytetracycline	<chem>CC1(C2C(C3C(C(=O)C(=C(C3(C(=O)C2=C(C4=C1C=CC=C4O)O)O)O)C(=O)N)N(C)C)O)O</chem>	<i>Streptomyces rimosus</i>
Panosialins	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC1=CC(=CC(=C1)OS(=O)(=O)O)OS(=O)(=O)O</chem>	<i>Streptomyces pseudoverticillus</i>
Paromomycin	<chem>C1C(C(C(C(C1N)OC2C(C(C(C(O2)CO)O)O)N)OC3C(C(C(O3)CO)OC4C(C(C(C(O4)CN)O)O)N)O)O)N</chem>	<i>Streptomyces rimosus var. paromomycinus</i>
Pentalenolactone	<chem>CC1C2C=C(C3C2(C=C1C)C4(CO4)C(=O)OC3)C(=O)O</chem>	<i>Streptomyces sp.</i>
Phenylacetate	<chem>C1=CC=C(C=C1)CC(=O)[O-]</chem>	<i>Streptomyces humidus</i>
Acide 3-phenylpropionique	<chem>C1=CC=C(C=C1)CCC(=O)O</chem>	<i>Streptomyces coelicolor</i>
Piperazimycin	<chem>CC(C)C=CC=CCC1C(=O)N2C(CC(CN2)Cl)C(=O)N3C(CCCN3)C(=O)NC(C(=O)OCC(=O)N4C(CC(CN4)O)C(=O)N1)(C)CO</chem>	<i>Streptomyces sp.</i>
Platencin	<chem>CC1(C2CC3CCC2(CCC1=O)CC3=C)CCC(=O)NC4=C(C=CC(=C4O)C(=O)O)OC5C(C(C(C(O5)CO)O)O)O</chem>	<i>Streptomyces platensis</i>
Polyketomycin	<chem>CC1C(CCC(O1)OC2C(=O)C(=C(C3(C2(CC4=C(C5=C(C(=O)C=C(C5=O)OC)C(=C4C3=O)O)C)O)O)O)C(=O)C)OC6CC(C(C(O6)C)OC(=O)C7=C(C=CC(=C7O)C)C)(C)O</chem>	<i>Streptomyces albospinus</i>
Polyoxin B	<chem>C1=C(C(=O)NC(=O)N1C2C(C(C(O2)C(C(=O)O)NC(=O)C(C(C(COC(=O)N)O)O)N)O)O)CO</chem>	<i>Streptomyces sp.</i>
Prodiginine	<chem>CCCCC1CCCCCCC2=C1C=C(N2)C=C3C(=C(C=N3)C4=CC=CN4)OC.[Cl-]</chem>	<i>Streptomyces coelicolor</i>
Puromycin	<chem>CN(C)C1=NC=NC2=C1N=CN2C3C(C(C(O3)C)O)NC(=O)C(CC4=CC=C(C=C4)OC)N)O.Cl.Cl</chem>	<i>Streptomyces alboniger</i>
Rapamycin	<chem>CC1CCC2CC(C(=CC=CC=CC(CC(C(=O)C(C(C(=CC(C(=O)CC(OC(=O)C3CCCCN3C(=O)C(</chem>	<i>Streptomyces sp.</i>

	<chem>=O)C1(O2)O)C(C)CC4CCC(C(C4)OC)O)C)C)O)OC)C)C)OC</chem>	
Resistomycin	<chem>CC1=CC(=O)C2=C(C3=C4C5=C2C1=C(C=C5C(C=C4C(=O)C=C3O)O)(C)C)O)O</chem>	<i>Streptomyces</i> sp. B033
Rhodostreptomycin	<chem>CC1C2(C(C(O1)OC3C(C(C(C(C3O)O)N=C(N)N)O)N=C(N)N)OC4C(C(C(C(O4)CO)O)O)NC)C(NC(=O)O2)O</chem>	<i>Rhodococcus fascians</i>
Ribostamycin	<chem>C1C(C(C(C(C1N)OC2C(C(C(C(O2)CN)O)O)N)OC3C(C(C(O3)CO)O)O)O)N.OS(=O)(=O)O</chem>	<i>Streptomyces ribosidificus</i>
Rifampin	<chem>CC1C=CC=C(C(=O)NC2=C(C(=C3C(=C2O)C(=C(C4=C3C(=O)C(O4)(OC=CC(C(C(C(C(C1O)C)O)C)OC(=O)C)C)OC)C)O)O)C=NN5CCN(CC5)C)C</chem>	<i>Streptomyces mediterranei</i>
Rosamicin	<chem>CCC1C(C2C(O2)(C=CC(=O)C(CC(C(C(C(C(=O)O1)O)C)OC3C(C(CC(O3)C)N(C)C)O)CC(=O)C)C)C</chem>	<i>Micromonospora rosaria</i>
Roseoflavin	<chem>CC1=CC2=C(C=C1N(C)C)N(C3=NC(=O)NC(=O)C3=N2)CC(C(C(CO)O)O)O</chem>	<i>Streptomyces davawensis</i>
Salinamide A	<chem>CCC(C)C1C(=O)NC2C3=CC=C(C=C3)OC(C4(CO4)C=CC(=O)NCC(=O)OCC(C(=O)OC(C(C(=O)N1)NC(=O)C(C)C(C(C)C)O)C)NC(=O)C(NC(=O)C(N(C2=O)C)CC5=CC=CC=C5)C(C)O)C</chem>	<i>Streptomyces</i> sp.
Salinosporamide	<chem>CC1=C(C(=O)N2C1C(C3C2CC(=O)CC3)O)CCCl</chem>	<i>Salinispora tropica</i>
Saquayamycin	<chem>CC1C(CCC(O1)OC2(CC(=O)C3(C4=C(C=CC3(C2)O)C(=O)C5=C(C4=O)C=CC(=C5O)C6CC(C(C(O6)C)OC7C=CC(=O)C(O7)C)O)O)C)OC8C=CC(=O)C(O8)C</chem>	<i>Micromonospora</i> sp.
Simocyclinone	<chem>CC1C(C(CC(O1)C2=C(C3=C(C=C2)C(=O)C45C(C3O)(O4)C(CC6(C5(C(=O)C=C(C6)C)O)O)O)OC(=O)C=CC=CC=CC(=O)O)OC(=O)C</chem>	<i>Streptomyces</i> sp.
Spinosyn	<chem>CCC1CCCC(C(C(=O)C2=CC3C4CC(CC4C=C3C2CC(=O)O1)OC5C(C(C(C(O5)C)OC)OC)OC)C)O</chem>	<i>Saccharopolyspora spinosa</i>
Spiramycin	<chem>CC1CC=CC=CC(C(CC(C(C(C(CC(=O)O1)O)O)C)OC2C(C(C(C(O2)C)OC3CC(C(C(O3)C)O)(C)O)N(C)C)O)CC(=O)C)OC4CCC(C(O4)C)N(C)C</chem>	<i>Streptomyces ambofaciens</i>
Streptogramin	<chem>CC1C=CC(=O)NCC=CC(=CC(CC(=O)CC2=NC(=CO2)C(=O)N3CCC=C3C(=O)OC1C(C)C)O)C</chem>	<i>Streptomyces halstedii</i>
Streptokordin	<chem>CC1=CC(=CC(=O)N1)C(=O)C</chem>	<i>Streptomyces</i> sp.
Streptolydigin	<chem>CC1C2C=CC3(CO3)C(O2)(OC1C(C)C=C(C)C=CC(=C4C(=O)C(N(C4=O)C5CCC(C(O5)C)O)C(C)C(=O)NC)O)C</chem>	<i>Streptomyces griseoflavus</i>
Streptomycin	<chem>CC1C(C(C(O1)OC2C(C(C(C(C2O)O)N=C(N)N</chem>	<i>Streptomyces griseus</i>

	<chem>)O)N=C(N)N)OC3C(C(C(C(O3)CO)O)O)NC)(C=O)O</chem>	
Streptothricin	<chem>C1C(C2C(C(=O)N1)N=C(N2)NC3C(C(C(C(O3)CO)OC(=O)N)O)NC(=O)CC(CCCN)N)O</chem>	<i>Streptomyces qinlingensis</i>
Tetracenomycin	<chem>CC1=C(C(=CC2=CC3=C(C(=C12)O)C(=O)C4(C(=O)C=C(C(C4(C3=O)O)O)OC)O)OC)C(=O)OC</chem>	<i>Streptomyces glaucescens</i>
Tetracycline	<chem>CC1(C2CC3C(C(=O)C(=C(C3(C(=O)C2=C(C4=C1C=CC=C4O)O)O)O)C(=O)N)N(C)C)O</chem>	<i>Streptomyces viridifaciens</i>
Thiocoraline	<chem>CN1C2CSSCC(C(=O)N(C(C(=O)SCC(C(=O)NCC1=O)NC(=O)C3=NC4=CC=CC=C4C=C3O)CSC)C)N(C(=O)CNC(=O)C(CSC(=O)C(N(C2=O)C)CSC)NC(=O)C5=NC6=CC=CC=C6C=C5O)C</chem>	<i>Streptomyces albus</i> , <i>Micromonospora marina</i>
Tobramycin	<chem>C1C(C(C(C(C1N)OC2C(C(C(C(O2)CO)O)N)O)O)OC3C(CC(C(O3)CN)O)N)N.OS(=O)(=O)O</chem>	<i>Streptomyces tenebrarius</i>
Transvalencin	<chem>C1C(N=C(O1)C2=CC=CC=C2O)C(=O)NC(CC CCNC=O)C(=O)O</chem>	<i>Nocardia transvalensis</i>
Trehalose dimycolates	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC(C(C CCCCCCCCCC1CC1CCCCCCCCCCCCCCCCC CC)C(=O)OCC2C(C(C(C(O2)OC3C(C(C(C(O3)CO)OC(=O)C(CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC C)C(CCCCCCCCCCCCCC4CC4CCCCCCCCC CCCCCCCCC)O)O)O)O)O)O)O)O</chem>	<i>Nocardia</i> sp.
Tunicamycin	<chem>CC(C)CCCCCCCCCCC=CC(=O)NC1C(C(C(O C1OC2C(C(C(C(O2)CO)O)O)NC(=O)C)CC(C3 C(C(C(O3)N4C=CC(=O)NC4=O)O)O)O)O)O</chem>	<i>Streptomyces torulosus</i>
Umezawamide	<chem>CCC1CC2CC3C=CC=CC(=O)NCCC(C4C(=C(C(=O)CC=CCC(C3C2C1C)O)C(=O)N4)O)O</chem>	<i>Pseudonocardiales</i> : <i>Umezawaea</i> sp.
Validamycin	<chem>C1C(C(C(C(C1NC2C=C(C(C(C2O)O)O)CO)O)O)OC3C(C(C(C(O3)CO)O)O)O)CO</chem>	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> var. <i>limoneus</i>
Vancomycin	<chem>CC1C(C(CC(O1)OC2C(C(C(OC2OC3=C4C=C5C=C3OC6=C(C=C(C=C6)C(C(C(=O)NC(C(=O)NC5C(=O)NC7C8=CC(=C(C=C8)O)C9=C(C=C(C=C9O)O)C(NC(=O)C(C(C1=CC(=C(O4)C=C1)Cl)O)NC7=O)C(=O)O)CC(=O)N)NC(=O)C(CC(C)C)NC)O)Cl)CO)O)O)(C)N)O</chem>	<i>Streptomyces orientalis</i>
Viomycin	<chem>C1C(N=C(NC1O)N)C2C(=O)NCC(C(=O)NC(C(=O)NC(C(=O)NC(=CNC(=O)N)C(=O)N2)CO)CO)NC(=O)CC(CCCN)N</chem>	<i>Streptomyces vinaceus</i>

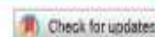
Travaux scientifiques

Articles :

- Mansouri, N., Benslama, O., and Arhab, R. (2021). Homology modeling, docking and molecular dynamics studies of some secondary metabolites of actinomycetes as biocontrol agents against the 3HNR enzyme of the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-13.
- Mansouri, N., and Benslama, O. (2022). In vitro and in silico investigation of the antifungal activity of endophytic fungi against phytopathogenic fungi of tomato. *Notulae Scientia Biologicae*, 14(1), 11050-11050.

Séminaires :

- MANSOURI Nadjwa, BENSLAMA Ouided, ARHAB Rabah. Biocontrôle de la Fusariose des cultures par l'utilisation de métabolites secondaires de champignons : Etude in silico. Séminaire National sur les Pesticides : Législation, environnement et santé (SNP 2021). Le 24 et 25 Novembre 2021 à l'université M'hamed Bougara de Boumerdes, Algérie.
<https://www.univ-boumerdes.dz/SNP2021/>
- Mansouri, N., Benslama Ouided., Meradi, L. and Arhab, R. Etude de l'activité antagoniste de microorganismes endophytes de quelques plantes contre des champignons phytopathogènes de fèves et de tomates. Séminaire National Webinaire. Bioressource ; Nutrition, santé et environnement. 17-18 Mai 2021. Université Mohamed Boudiaf. M'sila.
<http://virtuelcampus.univ-msila.dz/facsience/?p=3562>
[brochureBr_NSE2021_Fr.pdf \(univ-msila.dz\)](#)
- Mansouri, Nadjwa, Benslama Ouided, Arhab, Rabah. In Vitro And in Silico Investigation of the Antifungal Activity of Endophytic Fungi of Some Plants against Phytopathogenic Fungi of Tomato. 1 st International Agriculture, Biosystems and Technology Conference. theme, "Scaling Up innovative Solutions for Sustainable and Climate-Smart Agricultural Transformation." Tarlac Agricultural University, Philippines. July 22-23, 2021.
<https://www.ul.ie/sustainability/news-centre/events/1st-agriculture-biosystems-and-technology-conference-1st-abt-conference>
- Mansouri, Nadjwa, Benslama Ouided, Arhab, Rabah. Criblage du potentiel inhibiteur de métabolites de *Streptomyces* pour lutter contre l'agent phytopathogène *Fusarium oxysporum*. At the International 'Microbes For Life' first webinar, organized jointly by the LBSM laboratory and the Ecole Normale Supérieure Cheikh Mohamed Bachir Al Ibrahimy de Kouba. 20 – 22 October 2021.
<https://lbsm-lab.wixsite.com/microbesforlife2021>



Homology modeling, docking and molecular dynamics studies of some secondary metabolites of actinomycetes as biocontrol agents against the 3HNR enzyme of the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*

Nedjwa Mansouri, Ouided Benslama  and Rabah Arhab

Laboratory of Natural Substances, Biomolecules and Biotechnological Applications, Department of Natural and Life Sciences, Larbi Ben M'Hidi University, Oum El Bouaghi, Algeria

Communicated by Ramaswamy H. Sarma

ABSTRACT

Early blight of tomatoes is a common disease caused by the phytopathogenic fungi *Alternaria*, in particular the species *A. alternata*. This disease causes significant losses in the tomato harvest. The enzyme 1,3,8-trihydroxynaphthalene reductase (3HNR) is a key enzyme involved in the production of melanin, that plays a crucial role in the process of fungi invasion. This enzyme is the target of some chemical fungicides, but the problem of resistance against these molecules requires the search for new molecules that are both effective and environment-friendly. Actinomycetes represent an important source of secondary metabolites with antimicrobial activity. Thus, in this study 110 secondary metabolites of actinomycetes were subjected to an in silico screening of their antifungal activity as possible inhibitors of the 3HNR of *A. alternata*. For this reason, the 3D structure of this enzyme was modeled. Then, a molecular docking study of the secondary actinomycetal metabolites was carried out within the catalytic site of the enzyme. Indole-3-carboxylic acid, Streptokordin, 3-Phenylpropionic acid, Phenylacetate, and 8-Hydroxyquinoline have shown the most promising results with binding energies of -6.1 kcal/mol, -6.1 kcal/mol, -5.4 kcal/mol, -5.3 kcal/mol, and -5.0 kcal/mol, respectively. These metabolites have also shown satisfactory results for drug-likeness and ADMET analysis. The interaction stability of the Streptokordin, Indole-3-carboxylic acid, Phenylacetate, and 8-Hydroxyquinoline within the catalytic site of 3HNR was confirmed by the results of the MD simulation and MM-PBSA analyzes. With their favorable interactive and pharmacokinetic characteristics, these metabolites may be potential antifungal molecules against *A. alternata*, and good candidates for further studies.

ARTICLE HISTORY

Received 26 June 2021
Accepted 1 December 2021

KEYWORDS

Biocontrol; antifungal; *Alternaria alternata*; 1,3,8-trihydroxynaphthalene reductase; homology modeling; docking; ADMET; MD simulation

***In vitro* and *in silico* investigation of the antifungal activity of endophytic fungi against phytopathogenic fungi of tomato**

Nedjwa MANSOURI*, Ouided BENSLAMA

*Larbi Ben M'hidi University, Laboratory of Biotechnology of Natural Substances and Applications, Department of Natural and Life Sciences, Oum El Bouaghi, Algeria; Najwamansouri94@gmail.com (*corresponding author); Benslama.wided@hotmail.fr*

Abstract

Plants are threatened by several diseases caused by phytopathogenic fungi. Melanin is an important pathogenicity factor in some fungal plant diseases. The enzyme 6,3,8-trihydroxynaphthalene reductase (3HNR) is implicated in the catalysis of the melanin biosynthesis in fungi. The chemical fungicide Phthalide acts by inhibiting this enzyme. But despite its efficacy, Phthalide can be detrimental to environmental health, hence the need to look for natural inhibitors to combat phytopathogenic fungi. This study aimed to screen the antifungal activity of some endophytic strains against phytopathogenic fungi of tomato. A total of 7 endophytic fungi were isolated and pre-identified from different parts of celery, parsley, mint, and coriander. On the other hand, five phytopathogenic fungal strains were isolated and pre-identified from tomatoes. The agar cylinder method showed that the endophytic fungi strains *Fusarium* and *Trichoderma* have significant inhibitory activity against four phytopathogenic fungi identified as *Alternaria* and *Penicillium*. Molecular docking was also used to study the inhibitory effect of some bioactive fungal compounds against the 3HNR enzyme. Drug-likeness and ADMET analyses were conducted on the selected chemicals to test their reliability and pharmaceutical efficacy. Phenylethyl alcohol interacts intensely with the binding site of the 3HNR receptor giving binding energy of -5.3 Kcal/mol, which is close to the co-crystallized ligand Phthalide. In addition, ADMET and pharmacokinetic analysis revealed that Phenylethyl alcohol verify the majority of the filters and pharmacokinetic properties necessary to select an effective antifungal molecule, including Lipinski's and Veber's rules.

Keywords: 3HNR; biological control; endophytic microorganisms; molecular docking; phytopathogenic fungi

Résumé

Dans cette étude, 68 souches fongiques et 30 souches actinomycétales ont été isolés à partir de trois sols agricoles dans le but d'évaluer leur activité de biocontrôle *in vitro* et *in planta* contre trois souches d'*Alternaria* sp. isolées à partir des fruits de tomates infectées. En utilisant le test de confrontation directe, 9 isolats fongiques et un isolat actinomycétale ont présenté des taux d'inhibition de la croissance mycélienne des souche d'*Alternaria* variant entre 53,33% et 92%. La caractérisation micro-macroscopique des souches actives a permis leur attribution aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Streptomyces*. L'analyse des potentiels enzymatiques montrent que les souches antagonistes possèdent un arsenal enzymatique lié au biocontrôle incluant les enzymes amylase, protéase, cellulase, lipase, estérase, pectinase, laccase et chitinase. Les filtrats de culture de fermentation des trois souches fongiques les plus performantes ont montré des taux d'inhibition de la croissance d'*Alternaria* variant entre 3,70% et 87,76% pour différentes concentrations 10%, 20% et 40%. Dans le test *in planta* sur les tomates, ces filtrats ont présenté des taux d'inhibition de la taille de l'infection variant entre de 55,56 % et 100%. Les structures 3D des enzymes clés impliquées dans la virulence d'*Alternaria* cystathionine bêta lyase, homoserine O-acétyltransférase, glutathione réductase, pectate lyase, scytalone déshydratase, thioredoxin peroxydase, thioredoxin réductase, 3HNR et 4HNR ont été modélisées et leur qualité a été validées. 113 métabolites secondaires actinomycétales et 100 fongiques ont fait l'objet d'une analyse de leur activité inhibitrice contre les enzymes modélisées par docking moléculaire. Les résultats ont permis la sélection d'un nombre important de molécules avec une éventuelle activité antifongique. Une analyse pharmacocinétique des caractéristiques Drug Likeness et ADMET des métabolites prometteurs a permis de comprendre leur comportement au sein du corps humain ainsi que leur profil toxicologique. Une analyse de simulations dynamiques a été utilisée pour l'enzyme 3HNR avec les meilleurs ligands actinomycétales en 50 ns pour confirmer la stabilité des complexes enzymes-ligand en analysant leurs RMSD, RMSF, Rg, SASA et le nombre de liaisons d'hydrogène. Les résultats ont confirmé la stabilité de ces métabolites lors de leurs interactions avec le site actif de l'enzyme 3HNR. Sur la base des résultats trouvés, les souches fongiques et actinomycétales isolées et caractérisées dans cette étude ainsi que les métabolites secondaires de ces deux groupes taxonomiques peuvent être exploitées comme des agents de biocontrôle efficaces contre le phytopathogène *Alternaria*.

Mots clé : biocontrôle, alternariose, *Alternaria*, tomate, actinomycète, champignon, *in vitro*, *in planta*, *in silico*.

ملخص

في هذه الدراسة ، تم عزل 68 سلالة فطرية و 30 سلالة من الأكتينومييسات من ثلاثة تربة زراعية لتقييم نشاط المكافحة الحيوية في المختبر وفي النبات ضد ثلاث سلالات من *Alternaria* sp. معزولة عن ثمار الطماطم المصابة. باستخدام اختبار المواجهة المباشرة ، أظهرت 9 عزلات فطرية وعزلة واحدة من الأكتينومييسات معدلات تثبيط للنمو الفطري لسلالات *Alternaria* تتراوح بين 53.33% و 92%. سمح التوصيف المجهرى الدقيق للسلالات النشطة بإسنادها إلى أجناس الأسبرجيلوس والبنسيليوم والستربتوميسيس. يُظهر تحليل الإمكانيات الأنزيمية أن السلالات المناهضة تمتلك ثروة إنزيمية مرتبطة بالتحكم الحيوي بما في ذلك إنزيمات الأميليز والبروتياز والسليولاز والليباز والإستريز والبكتيناز واللاكاز والكتيناز. أظهرت ترشيح ثقافة التخمر لأفضل ثلاث سلالات فطرية أداءً معدلات تثبيط نمو *Alternaria* تتراوح بين 3.70% و 87.76% لتركيزات مختلفة 10% و 20% و 40%. في اختبار النبات على الطماطم ، أظهرت هذه الفلاتر معدلات تثبيط حجم العدوى تتراوح بين 55.56% و 100%. تم التحقق من صحة الهياكل ثلاثية الأبعاد للإنزيمات الرئيسية المشاركة في ضراوة *Alternaria* glutathione و homoserine O-acetyltransferase و cystathionine beta lyase و thioredoxin peroxidase و scytalone dehydratase و pecate lyase و reductase و thioesterase و thioesterase. تم تحليل 113 مادة من أكتينومييسيتال و 100 مادة فطرية لنشاطها المثبط ضد الإنزيمات التي تم نمذجتها عن طريق الالتحام الجزيئي. سمحت النتائج باختيار عدد كبير من الجزيئات ذات النشاط المضاد للفطريات. أتاح تحليل الحرائك الدوائية لخصائص تشابه الدواء و ADMET للمواد الواعدة فهم سلوكها داخل جسم الإنسان بالإضافة إلى خصائصها السمية. تم استخدام تحليل المحاكاة الديناميكية لإنزيم 3HNR مع أفضل الروابط الشعاعية في 50 نانوثانية لتأكيد ثبات مجمعات الإنزيمات يجند من خلال تحليل RMSD و RMSF و Rg و SASA وعدد الروابط الهيدروجينية. أكدت النتائج استقرار هذه المستقلبات أثناء تفاعلها مع الموقع النشط لإنزيم 3HNR. بناءً على النتائج التي تم العثور عليها ، يمكن استغلال السلالات الفطرية والأكتينومييسات المعزولة والمميزة في هذه الدراسة بالإضافة إلى المنتجات الثانوية لهاتين المجموعتين التصنيفيتين كعوامل فعالة للمكافحة الحيوية ضد مسببات الأمراض النباتية *Alternaria* .

الكلمات المفتاحية: المكافحة الحيوية ، *Alternaria* ، البديل ، الطماطم ، الأكتينومييسات ، الفطريات ، في المختبر ، في النبات ، في الافتراضي.

Abstract

In this study, 68 fungal strains and 30 actinomycetal strains were isolated from three agricultural soils in order to evaluate their *in vitro* and *in planta* biocontrol activity against three strains of *Alternaria* sp. isolated from the fruits of infected tomatoes. Using the direct confrontation test, 9 fungal isolates and one actinomycetale isolate showed inhibition rates of mycelial growth of *Alternaria* strains varying between 53.33% and 92%. The micro-macroscopic characterization of the active strains allowed their attribution to the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Streptomyces*. The analysis of the enzymatic potentials show that the antagonist strains possess an enzymatic arsenal linked to biocontrol including the enzymes amylase, protease, cellulase, lipase, esterase, pectinase, laccase and chitinase. The fermentation culture filtrates of the three best performing fungal strains showed *Alternaria* growth inhibition rates varying between 3.70% and 87.76% for different concentrations 10%, 20% and 40%. In the *in planta* test on tomatoes, these filtrates showed infection size inhibition rates varying between 55.56% and 100%. The 3D structures of the key enzymes involved in the virulence of *Alternaria* cystathionine beta lyase, homoserine O-acetyltransferase, glutathione reductase, pectate lyase, scytalone dehydratase, thioredoxin peroxidase, thioredoxin reductase, 3HNR and 4HNR have been modeled and their quality has been validated. 113 actinomycetal and 100 fungal secondary metabolites were analyzed for their inhibitory activity against enzymes modeled by molecular docking. The results allowed the selection of a large number of molecules with possible antifungal activity. A pharmacokinetic analysis of the Drug Likeness and ADMET characteristics of the promising metabolites made it possible to understand their behavior within the human body as well as their toxicological profile. Dynamic simulation analysis was used for the 3HNR enzyme with the best actinomycetal ligands in 50 ns to confirm the stability of the enzyme-ligand complexes by analyzing their RMSD, RMSF, Rg, SASA and number of hydrogen bonds. The results confirmed the stability of these metabolites during their interactions with the active site of the 3HNR enzyme. Based on the results found, the fungal and actinomycetal strains isolated and characterized in this study as well as the secondary metabolites of these two taxonomic groups can be exploited as effective biocontrol agents against the phytopathogen *Alternaria*.

Key words: biocontrol, *Alternaria*, tomato, actinomycete, fungus, *in vitro*, *in planta*, *in silico*.

Nom: Mansouri	Diplôme : Doctorat 3ème cycle LMD
Prénom: Nedjwa	Date de soutenance : 01/06/2023
Titre : Criblage du potentiel de biocontrôle de différents isolats microbiens	
<p>Résumé</p> <p>Dans cette étude, 68 souches fongiques et 30 souches actinomycétales ont été isolés à partir de trois sols agricoles dans le but d'évaluer leur activité de biocontrôle <i>in vitro</i> et <i>in planta</i> contre trois souches d'<i>Alternaria</i> sp. isolées à partir des fruits de tomates infectées. En utilisant le test de confrontation directe, 9 isolats fongiques et un isolat actinomycétale ont présenté des taux d'inhibition de la croissance mycélienne des souche d'<i>Alternaria</i> variant entre 53,33% et 92%. La caractérisation micro-macroscopique des souches actives a permet leur attribution aux genres <i>Aspergillus</i>, <i>Penicillium</i> et <i>Streptomyces</i>. L'analyse des potentiels enzymatiques montrent que les souches antagonistes possèdent un arsenal enzymatique lié au biocontrôle incluant les enzymes amylase, protéase, cellulase, lipase, estérase, pectinase, laccase et chitinase. Les filtrats de culture de fermentation des trois souches fongiques les plus performantes ont montré des taux d'inhibition de la croissance d'<i>Alternaria</i> variant entre 3,70% et 87,76% pour différentes concentration 10%, 20% et 40%. Dans le test <i>in planta</i> sur les tomates, ces filtrats ont présenté des taux d'inhibition de la taille de l'infection variant entre de 55,56 % et 100%. Les structures 3D des enzymes clés impliquées dans la virulence d'<i>Alternaria</i> cystathionine béta lyase, homoserine O-acétyltransférase, glutathione réductase, pecate lyase, scytalone déshydratase, thioredoxin peroxidase, thioredoxin réductase, 3HNR et 4HNR ont été modélisées et leur qualité a été validées. 113 métabolites secondaires actinomycétales et 100 fongiques ont fait l'objet d'une analyse de leur activité inhibitrice contre les enzymes modélisées par docking moléculaire. Les résultats ont permis la sélection d'un nombre important de molécules avec une éventuelle activité antifongique. Une analyse pharmacocinétique des caractéristiques Drug Likeness et ADMET des métabolites prometteurs a permis de comprendre leur comportement au sein du ceps humain ainsi que leur profil toxicologique. Une analyse de simulations dynamiques a été utilisée pour l'enzyme 3HNR avec les meilleurs ligands actinomycétales en 50 ns pour confirmer la stabilité des complexes enzymes-ligand en analysant leurs RMSD, RMSF, Rg, SASA et le nombre de liaisons d'hydrogène. Les résultats ont confirmé la stabilité de ces métabolites lors de leurs interactions avec le site actif de l'enzyme 3HNR. Sur la base des résultats trouvés, les souches fongiques et actinomycétales isolées et caractérisées dans cette étude ainsi que les métabolites secondaires de ces deux groupes taxonomiques peuvent être exploitées comme des agents de biocontrôle efficaces contre le phytopathogène <i>Alternaria</i>.</p> <p>Mots clé : biocontrôle, alternariose, <i>Alternaria</i>, tomate, actinomycète, champignon, <i>in vitro</i>, <i>in planta</i>, <i>in silico</i>.</p>	