

**ACTIVITÉ ANTIMITOTIQUE DE DEUX ESPÈCES D'ASPERGILLUS:
 MYCOENDOPHYTES FOLIAIRES DE *LIMONIASTRUM FEEI* (GIRARD) BATT.
 D'OUED AGHLAL (BECHAR, ALGÉRIE)**

MEDJEBER Mohammed^{1,2*}, SMAÏL-SAADOUN Noria¹ et SAIDI Faïrouz²

1. Laboratoire Ressources Naturelles, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, Algérie. B.P : 17 route de Hassnaoua-Tizi Ouzou.
2. Laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Santé, Université Blida, Algérie. B.P : 270 route de Soumâa-Blida.

Reçu le 28/02/2018, Révisé le 03/06/2018, Accepté le 06/06/2018

Résumé

Description du sujet : Dans le cadre de la recherche de nouveaux composés bioactifs puissants qui inhibent le développement des tumeurs, Il nous a paru intéressant d'étudier l'action antimitotique de deux mycoendophytes associés aux feuilles de *Limoniastrum feei* (de Gir.) Batt. : plante médicinale de la région de Béchar (Algérie).

Objectifs : Ce travail consiste à isoler les deux mycoendophytes (*Aspergillus niger* et *Aspergillus nidulans*) et d'extraire leurs métabolites afin de pouvoir tester l'activité antimitotique de ces derniers.

Méthodes : L'isolement a été réalisé par culture de fragments des feuilles de *L. feei* sur milieu PDA. Après la purification et l'identification à l'échelle phénotypique, une extraction des métabolites actifs par méthode hydroalcoolique a été menée, en utilisant deux solvants : l'acétate d'éthyle et le méthanol. Notamment, l'effet antimitotique des extraits fongiques a été évalué *in vitro* sur des cellules méristématiques d'*Allium cepa*.

Résultats : Le calcul des indices mitotiques et des indices des phases a montré une efficacité comparable à celle de la colchicine utilisée comme témoin positif. Une Anova réalisée dans le but de comparer ces indices avec un témoin négatif des cellules non traitées a révélé une différence hautement significative (p=0,00).

Conclusion : Nous avons conclu suite à ces résultats que les deux espèces d'*Aspergillus* étudiées représentent une source prometteuse dans la production des substances naturelles d'intérêt thérapeutique antimitotique.

Mots clés: mycoendophytes; *Aspergillus*; *Limoniastrum feei*; effet antimitotique; *Allium cepa*; Béchar (Algérie).

**ANTIMITOTIC ACTIVITY OF TWO SPECIES OF *ASPERGILLUS*: FOLIAR
 MYCOENDOPHYTES OF *LIMONIASTRUM FEEI* (GIRARD) BATT. OF OUED
 AGHLAL (BECHAR, ALGERIA)**

Abstract

Description of the subject : In the search for new powerful bioactive compounds that inhibit the development of tumors, it seemed interesting to study the antimitotic action of two mycoendophytes associated with the leaves of *Limoniastrum feei* (Gir.) Batt. : medicinal plant of the region of Bechar (Algeria).

Objectives : This work involves isolating mycoendophytes (*Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans*) and extracting their metabolites in order to test the antimitotic activity of these two fungi.

Methods : Isolation was done by culturing fragments of leaves of *L. feei* on PDA medium. After purification and phenotypic identification, extraction of the active metabolites was performed by hydroalcoholic method using two solvents: ethyl acetate and methanol. thus, the antimitotic effect of the fungal extracts was evaluated *in vitro* on meristematic cells of *Allium cepa*.

Results : Calculation of mitotic index and phases index showed efficacy comparable to that of colchicine used as a positive control. An Anova performed to compare these index with a negative control of untreated cells revealed a highly significant difference (p=0.00).

Conclusion : We concluded from these results that the two *Aspergillus* species studied represent a promising source in the production of natural substances in antimitotic therapeutic interest.

Keywords : Mycoendophytes; *Aspergillus*; *Limoniastrum feei*; antimitotic effect; *Allium cepa*; Bechar (Algeria).

* Auteur correspondant : MEDJEBER Mohammed, E-mail : mohamedmazen@hotmail.fr

INTRODUCTION

De nos jours, la quête de nouvelles substances naturelles bioactives est devenue une priorité de la recherche scientifique, surtout suite à l'augmentation des effets indésirables liés à l'utilisation de produits synthétiques, la diminution de l'efficacité des médicaments disponibles, l'émergence spectaculaire de nouvelles pathologies et la prévalence accrue des maladies rebelles, comme le ravage causé par le cancer (14,1 million de personnes atteintes de cancer selon la dernière estimation en 2012 de l'OMS) [1].

Dans la nature, différentes sources (végétaux, animaux, microorganismes) peuvent être potentiellement un bon réservoir de molécules d'intérêt médical [2]. Plusieurs types de microorganismes, tels les champignons ont été exploités dans l'investigation de ces molécules, à la différence des mycoendophytes qui restent timidement étudiés dans cet axe.

Les mycoendophytes sont des champignons microscopiques colonisateurs des tissus internes des plantes vivantes [3, 4], sans qu'ils ne causent aucun symptôme [5, 6]. Ces mycètes établissent des interactions symbiotiques avec leur partenaire végétal. En tirant les éléments nutritifs dans la plante hôte, ils produisent des métabolites nécessaires pour la protection de cette dernière contre les pathogènes et les différents ravageurs [7, 8].

Nous nous sommes intéressés dans ce travail aux mycoendophytes de *Limoniastrum feei* (de Gir.) Batt., qui apparaît dans une récente nomenclature sous le nom de *Ceratolimon feei* (Girard) M.B. Crespo et Lled [9]. Cette plante spontanée est endémique du Sahara septentrional algérien et marocain [10]. C'est un arbuste bas de 10 à 40 cm de hauteur, avec des feuilles longues et plates serrées en rosettes basales. Elle fait partie de la famille des Plumbaginacées [11]. Cette espèce est appréciée pour ces propriétés médicinales. Elle est utilisée dans le traitement de la bronchite et des infections gastriques [12]. Des activités biologiques liées à cette essence sont décrites dans plusieurs études, notamment l'activité antioxydante [13, 14] et l'activité antimicrobienne [15].

Cette étude a porté sur la partie foliaire de *L. feei* et a consisté à : (i) isoler les mycoendophytes concernés, à savoir : *Aspergillus niger* et *A. nidulans* ;

(ii) extraire les métabolites fongiques des deux espèces d'*Aspergillus* après leur purification ; (iii) tester *in vitro*, l'effet antimutogène des extraits fongiques de ces deux mycoendophytes en comparaison avec un témoin synthétique puissant.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Isolement et identification des souches d'*Aspergillus*

La récolte a concerné 23 sujets de *L. feei* en bon état phytosanitaire échantillonnés d'une manière aléatoire dans la région d'Oued Aghlal (Béchar, Algérie). 10 feuilles de chaque sujet ont été prélevées et traitées à l'HCl (1N), afin d'enlever le calcaire donnant un aspect coriace à ces feuilles. Ces dernières sont ensuite débarrassées de microorganismes épiphytes par une stérilisation superficielle, en suivant le protocole de Helander *et al.* [16]. Cette étape consiste en deux traitements par l'éthanol (96°) intercalés par un traitement à l'eau de javel, ces traitements sont effectués par alternance avec des lavages à l'eau distillée stérilisée. Après cette étape, les feuilles ont été coupées en petits fragments de 2 à 5 mm et placées aseptiquement à température ambiante sur milieu PDA (Potato - Dextrose - Agar). Après deux mois d'incubation et parmi les différents isolats fongiques émergés autour de ces fragments, *A. niger* et *A. nidulans* ont été isolés et identifiés à l'échelle phénotypique suivant les caractéristiques macroscopiques de la colonie [17] et selon les critères microscopiques tels : la morphologie, la forme, la taille et la couleur des hyphes et des spores, en se référant également aux clés d'identification de Kiffer et Morelet [18].

2. Fermentation et extraction des souches fongiques

Sur les deux mycoendophytes identifiés et purifiés précédemment, 4 pièces de 6 mm de diamètre pour chaque espèce ont été prélevées à partir d'une culture de 5 jours, préalablement cultivées sur PDA et incubées à 27°C. Ces morceaux sont ensuite inoculés aseptiquement dans des flacons de 500 ml contenant 200 ml de PDB (Potato - Dextrose - Broth).

L'ensemble a été bien fermé et incubé sous agitation périodique dans les conditions d'anaérobiose sur une période allant jusqu'à 6 semaines [19, 20].

À l'aide d'une bande à gaze propre, le contenu des flacons a été filtré afin de séparer le mycélium du filtrat (fluide de culture). Ce dernier a été centrifugé à 5000 tours/min pendant 15 minutes. Le culot qui contient le reste du mycélium et les spores a été rajouté au mycélium de filtration. Une macération de 7 jours dans le méthanol est faite sur les mycéliums, afin de récupérer l'extrait méthanolique [19, 21].

Le surnageant du filtrat est mélangé au même volume d'acétate d'éthyle et agité pendant 2 heures à une température de 40°C. Ce mélange est ensuite mis au repos dans des ampoules de décantation, pour séparer la phase organique de la phase aqueuse. Par la suite, la phase organique a été évaporée du solvant à l'aide d'un rotavapeur à 70°C. Enfin, le concentré d'évaporation a été dilué au DMSO (diméthyle de sulfoxyde) pour obtenir l'extrait d'acétate d'éthyle brut [22, 23].

Après évaporation et lyophilisation, les deux extraits d'acétate d'éthyle et de méthanol ont été ajustés pour l'activité antimittotique à deux concentrations différentes pour chacun (10 et 5 mg/ml).

3. Essai antimittotique

L'activité cytogénétique des extraits fongiques a été réalisée *in vitro* par le test d'*Allium cepa* adopté par Shweta et al. [24]. En effet, des bulbes d'oignon (*Allium cepa*) ont été placés dans des récipients remplis d'eau de façon à ce que les bases des bulbes baignent dans l'eau pendant 3 jours. Les apex racinaires dans lesquels les mitoses sont nombreuses ont été coupés et trempés 24h dans des cupules, contenant les extraits fongiques à deux concentrations différentes, la colchicine (témoin positif) et l'eau (témoin négatif). Ces apex sont ensuite fixés à l'alcool acétique pendant 3h et colorés au carmin acétique, afin d'observer au microscope optique les différents stades de la mitose (Fig. 1).

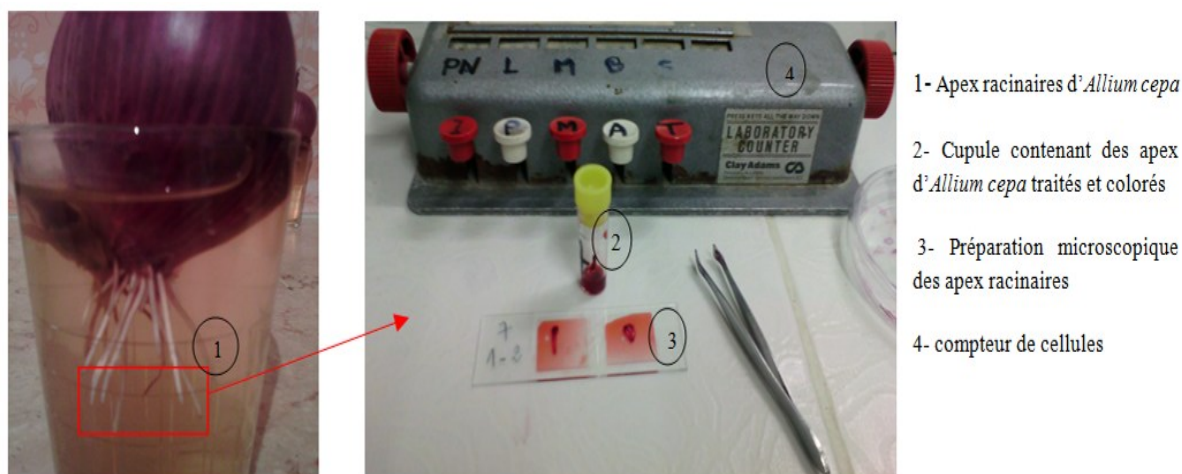


Figure 1 : Test d'*Allium cepa*

4. Analyse des données antimittotiques

Pour chaque extrait, 5 apex ont été traités et 1000 cellules ont été observées. L'analyse cytogénétique a été mise au point par l'évaluation des 2 paramètres suivants.

Indice des phases : cet indice est calculé afin de déterminer le pourcentage des cellules dans chaque phase de la mitose (P, M, A, T) [25, 26].

$$IP (\%) = \frac{\text{Nombre de cellules d'une seule phase mitotique}}{\text{Nombre total des cellules examinées}} \times 100$$

Indice mitotique : cet indice consiste à comptabiliser le pourcentage des cellules arrêtées en mitose sur le total des cellules examinées [24, 27, 28, 29].

$$IM (\%) = \frac{P + M + A + T}{\text{Nombre total des cellules examinées}} \times 100$$

RÉSULTATS

Avec : P = prophase ; M = métaphase ; A = anaphase ; T = télophase.

5. Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont été calculés et présentés sous forme de tableaux (Excel 2007). Des analyses de variance sont faites, afin de comparer entre les différents indices mitotiques. Cette analyse a été réalisée grâce au logiciel Stat Box 6.40.

Les observations microscopiques des cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées ou non par les extraits fongiques ont permis de visualiser les différents stades du développement mitotique (Fig. 2). En outre, quelques aberrations et anomalies chromosomiques de nature clastogénique touchant la structure des chromosomes ont aussi été révélées. Ces aberrations n'ayant pas fait objet dans cette étude et ont été exclus du comptage.

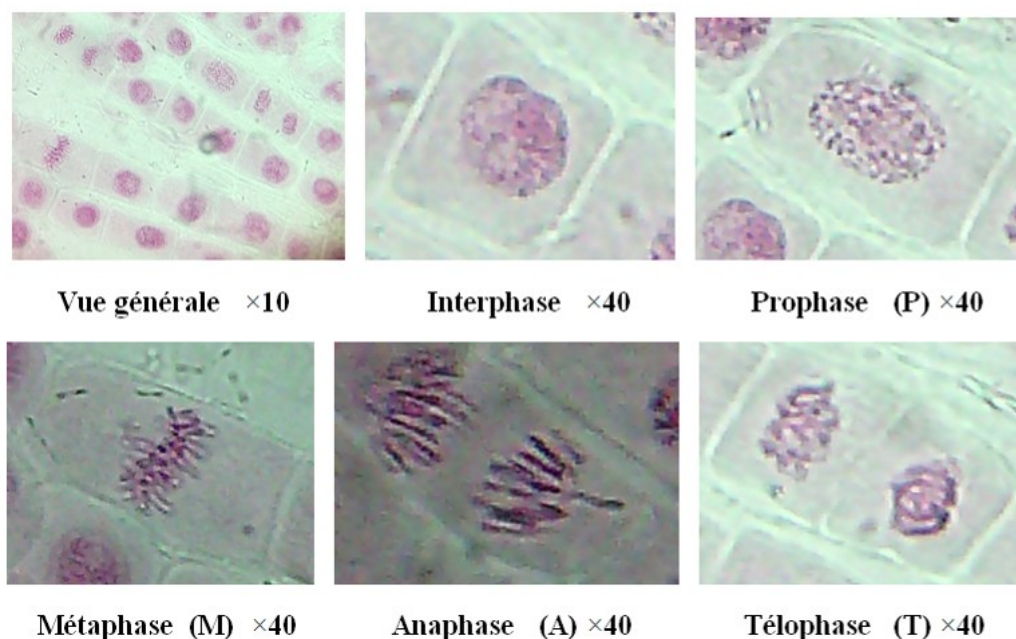


Figure 2 : Cellules méristématiques d'*Allium cepa* représentant les différentes phases de la mitose.

1. Indices des phases

Les pourcentages des différentes phases de la mitose calculés sur l'ensemble des cellules examinées sont rapportés dans le Tableau 1. L'extrait d'acétate d'éthyle comme l'extrait méthanolique des deux espèces d'*Aspergillus* ont donné des effets comparables pour chaque phase de la mitose. Il est à noter que l'indice des phases le plus élevé dans cet ensemble est celui qui correspond à la prophase, contrairement aux autres stades de la

division cellulaire qui sont minoritairement présents.

Cette élévation au niveau de la prophase est indépendante de la concentration d'extrait fongique utilisée. Les indices des phases des cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées par les deux concentrations de colchicine sont élevés pour la métaphase. Tandis que les autres phases sont moins observées. Les pourcentages des 4 phases chez le témoin négatif sont relativement élevés par rapport à ceux des extraits fongiques et de la colchicine. Ces indices ne sont dominés par aucune phase de la mitose à la différence des cellules traitées.

Tableau 1 : Indices des phases des cellules méristématiques d'*Allium cepa*

		Concentration (mg/ml)	Indice des phases (%)			
			P	M	A	T
Extrait d'acétate d'éthyle	<i>A. niger</i>	05	32 ±1,17	4,4 ±0,29	1,4 ±0,24	2,2 ±0,34
		10	29,2 ±0,96	2,9 ±0,62	1 ± 0,35	2,6 ±0,33
		05	27 ±0,74	3,7 ±0,68	2,5 ±0,63	2,6 ±0,37
Extrait méthanolique	<i>A. nidulans</i>	10	26,3 ±1,42	4 ±1	1,2 ±0,3	2,4 ±0,43
		05	25,7 ±0,86	5,2 ±0,83	2,4 ±0,4	2,7 ±0,37
		10	28,5 ±1,29	2,9 ±0,56	0,8 ±0,2	1,7 ±0,2
Colchicine	<i>A. niger</i>	05	27,5 ±1,11	4,3 ±0,58	1,3 ±0,12	1,3 ±0,2
		10	25,6 ±0,79	5 ±1,15	1,3 ±0,71	2,1 ±0,5
		0,5	7 ±1,65	27,3 ±1,27	0,3 ±0,12	2,9 ±0,51
Témoin négatif		01	1,7 ±0,60	26,3 ±1,91	0,3 ±0,12	1,7 ±0,3
		-	23,7 ±1,12	20,2 ±0,94	13,5 ±0,57	17,4 ±0,67

2. Indices mitotiques

Les différents indices mitotiques des cellules racinaires d'*Allium cepa* sont classés dans un ordre décroissant (Tableau 2). La lecture du tableau 2 montre une diminution remarquable des indices mitotiques pour les cellules traitées par les deux extraits fongiques, comparativement à ceux calculés pour les cellules traitées avec de la colchicine. Nous pouvons constater aussi que ces indices sont légèrement moins élevés chez *A. nidulans* par rapport *A. niger*. Les cellules du témoin négatif ont l'indice mitotique le plus élevé (74,8%), tandis que la colchicine à 1 mg/ml apparaît avec le plus faible indice mitotique (30%).

L'anova indique une différence hautement significative ($p = 0,00$) entre les différents indices mitotiques. 3 groupes homogènes apparaissent, plus loin du témoin négatif. Effectivement, nous pouvons voir l'individualisation de la colchicine à la concentration de 1 mg/ml dans le groupe a. La colchicine à 0,5 mg/ml et l'extrait d'acétate d'éthyle pour *A. niger* à 5 mg/ml ont donné des indices mitotiques comparables et sont classés dans le même groupe b. Les autres extraits fongiques possèdent un effet antimittotique situé entre les deux groupes a et b. Ces extraits sont rangés dans le groupe ab. Donc ce dernier se trouve entre les deux concentrations du témoin positif (colchicine).

Tableau 2 : Indices mitotiques des cellules méristématiques d'*Allium cepa* avec leurs groupes homogènes.

Extraits	Concentration (mg/ml)	Indice mitotique (%)
Témoin négatif	-	74,8 ±0,64
Acétate d'éthyle (<i>A. niger</i>)	05	40 ±1,27b
Colchicine	0,5	37,5 ±2,27b
Méthanol (<i>A. niger</i>)	05	35,9 ±0,97ab
Acétate d'éthyle (<i>A. nidulans</i>)	05	35,8 ±0,84ab
Acétate d'éthyle (<i>A. niger</i>)	10	35,7 ±1,77ab
Méthanol (<i>A. nidulans</i>)	05	34,4 ±1,32ab
Méthanol (<i>A. nidulans</i>)	10	34 ±1,68ab
Méthanol (<i>A. niger</i>)	10	33,9 ±1,63ab
Acétate d'éthyle (<i>A. nidulans</i>)	10	33,9 ±0,93ab
Colchicine	01	30 ±1,15a

DISCUSSION

Le modèle expérimentale d'*Allium cepa* est l'un des meilleurs systèmes d'évaluation de l'activité antimittotique *in vitro*. Ce test est validé par le Programme de l'Environnement des Nations Unies (UNEP) et le Programme International de la Sécurité Chimique (IPCS),

il est utile pour toute étude préliminaire des substances anticancéreuses [30]. En outre, les cellules végétales étant généralement plus grosses que les cellules animales et donc plus faciles à observer au microscope, ne soulevant pas de problèmes éthiques, facile à obtenir et peu coûteux.

Ce bioessai date de 1938 avec les premiers travaux réalisés sur les cellules racinaires d'*Allium cepa* en étudiant l'effet antimittotique de la colchicine [31].

La colchicine est un alcaloïde extrait des tiges souterraines du colchique ; *Colchicum autumnale* [26]. Elle est utilisée couramment dans le traitement de différentes tumeurs tissulaires. Son action se résume par blocage de la formation du fuseau mitotique [32]. En se fixant sur une molécule de la tubuline, elle empêche sa polymérisation en microtubules. L'absence ou l'insuffisance de ces dernières entraîne un blocage de la mitose au stade de métaphase [33]. Cette approche confirme le résultat de l'indice des phases de la colchicine obtenu dans cette étude.

Le pourcentage élevé des indices des phases au niveau de la prophase chez l'ensemble des extraits fongiques testés indique la présence d'un empêchement de passage aux autres stades de la division cellulaire à ce niveau. Cette même action est enregistrée par l'extrait aqueux de *Solanum torvum*, plante de la famille des Solanacées [34]. Il semble que les composés présents dans ces extraits de *A. niger* et *A. nidulans* : endophyte foliaire de *Limoniastrum feei*, bloquent la division cellulaire avant la métaphase, ce qui diffère du mécanisme de blocage de la colchicine.

Différents agents naturels anticancéreux sont produits par les endophytes. Le taxol est un diterpénoïde capable de tuer les cellules tumorales en améliorant l'assemblage des microtubules et en inhibant leur dépolymérisation en tubulines. Il est extrait de plusieurs endophytes ; *Taxomyces andreanae* [35], *Pestalotiopsis microspora* [36], *Alternaria alternata*, *Chaetomella raphigera*, *Monochaetia sp.*, *Periconia sp.* et *Pithomyces sp.* [37]. Récemment, une équipe de recherche a mis au point la présence de lapachol chez *A. niger* ; mycoendophyte de *Tabebuia argentea* [29]. Le lapachol empêche la réplication de l'ADN cellulaire en interférant avec le groupe des enzymes topoisomérases, ce qui bloque la division cellulaire en G2/M cycle [38].

La diminution constatée au niveau des différents indices mitotiques chez les cellules racinaires d'*Allium cepa* indique un effet mitodépresseur de tous les extraits fongiques testés. L'indice mitotique reste le meilleur paramètre d'estimation du taux de cellules en division [39].

Les extraits d'acétate d'éthyle comme les extraits méthanoliques ayant donné des pourcentages similaires et élevés des cellules arrêtées en mitose. Cette excellente activité antimittotique est comparable à celle de la colchicine. De ce fait, nous avons compris que les métabolites extraits par les deux solvants utilisés ont la même efficacité envers l'activité antimittotique.

Parmi les études menées sur l'activité antimittotique des mycoendophytes, nous pouvons citer celle de Channabasava et Melappa [29], qui a montré un indice mitotique de 22,5% d'un extrait méthanolique d'*A. niger* associé à *Tabebuia argentea* (Inde). Cet indice est sensiblement inférieur à celui trouvé dans notre étude (33,9%). Cela se justifie par la nature de la plante hôte et le type d'interaction établie avec les mycoendophytes partenaires. Ainsi, il est admis que la quantité et la qualité des métabolites secondaires produites par les endophytes sont influencées par l'habitat et l'environnement de la plante hôte [40].

Par ailleurs, en comparant les indices mitotiques de nos extraits fongiques avec ceux de plusieurs extraits de plantes : *Tetraclinis articulata* (92,4%), *Withania frutescens pauquy* (72,28%), [31] et *Solanum torvum* 42% [39], nous avons compris que les mycoendophytes produisent plus de composés efficaces dans l'activité antimittotique.

CONCLUSION

Les deux espèces *A. niger* et *A. nidulans* isolées sur les feuilles de *Limoniastrum feei* représentent un bon réservoir de molécules puissantes, ayant un pouvoir comparable à celui de la colchicine sur la division cellulaire. Ces mycoendophytes sont considérés comme une source prometteuse de produits naturels à effet thérapeutique. Il est souhaitable dans l'avenir d'identifier ces métabolites et d'investir leur effet antimittotique sur les cellules cancéreuses d'origine animale.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **International Agency for Research on Cancer (IARC). Globocan. (2012).** Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.

- [2]. **Baker D., Mocek U. & Garr C. (2000).** *Natural products vs. combinatorials: A case study.* In: *Biodiversity: new leads for pharmaceutical and agrochemical industries.* Wrigley S.K., Hayes M.A., Thomas R., Chrystal E.J.T & Nicholson N. (Ed.), United Kingdom, The Royal Society of Chemistry, 66-72. p.
- [3]. **Petrini O. (1985).** Wirtsspezifität endophytischer Pilze bei einheimischen Ericaceae. *Botanica Helvetica.* 95 : 213-218.
- [4]. **Pirttilä A.M., Laukkanen H., Pospiech H., Myllylä R. & Hohtola A. (2000).** Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch Pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 66 : 3073-3077.
- [5]. **Petrini O. (1991).** *Fungal endophytes of tree leaves.* In: *Microbial Ecology of Leaves.* Andrews J.H & Hirano S.S. (Ed.), Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. Springer, New York, p. 179-197.
- [6]. **Wilson D. (1995).** Endophytes-the evolution of the term, a clarification of its use and definition. *Oikos* 73 : 274-276.
- [7]. **Azevedo J.L., Maccheroni J.R.W., Pereira J.O. & DE Araujo W.L. (2000).** Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology.* 3 (1) : 40-65.
- [8]. **Rodriguez R.J., Henson J., Van Volkenburgh E., Hoy M., Wright L., Beckwith F., Kim Y.O. & Redman R.S. (2008).** Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *Isme Journal.* 2 (4) : 404-416.
- [9]. **Dobignard A. & Chatelain C. (2013).** *Index synonymique de la flore d'Afrique du Nord.* Vol (5): Dicotyledoneae : Oleaceae – Zygophyllaceae. Editions des Conservatoire et Jardin botaniques, Genève, 122 p..
- [10]. **Quezel P. & Santa S. (1963).** *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.* CNRS (Ed.), Paris, 350-476 p.
- [11]. **Ozenda P. (2004).** *Flore et végétation du Sahara.* CNRS, (Ed.), Paris, 624 p.
- [12]. **Belboukhari N. & Cheriti A. (2009).** Analysis and Isolation of Saponins from *Limoniastrum feei* by LC- UV. *Chem. Nat. Comp.* 45 (5) : 756-758.
- [13]. **Chaabi M.B., Beghidjab N., Benayacheb S. & Lobsteina A. (2008).** Activity-Guided Isolation of Antioxidant Principles from *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. *Z. Naturforsch.* 63c : 801-807.
- [14]. **El Haci I.A., Didi A., Bekkara F.A. & Gherib M. (2009).** *In vitro* antioxidant activity and total phenolic contents in methanol crude extracts from the algerian medicinal plant *limoniastrum feei*. *scientific study & research.* 4 : 329-335.
- [15]. **Belboukhari A. & Cheriti N. (2005).** Antimicrobial activity of aerial part crude extract from *Limoniastrum feei*. *Asian J. Plant Sci.* 4 : 496-498.
- [16]. **Helander M.L., Sieber T.N., Petrini O. & Neuvonen S. (1994).** Endophytic fungi in Scot's pine needles: spatial variation and consequences of simulated acid rain. *Canadian Journal of Botany.* 72 : 1108-1113.
- [17]. **Suryanarayanan T.S., Venkatesan G. & Murali T.S. (2003).** Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns. *Current Science.* 85 (4) : 489-493.
- [18]. **Kiffer E. & Morelet M. (1997).** Les deutéromycètes; classification et clés d'identification générique. (INRA) Paris, 214-218 p.
- [19]. **Khan R. (2007).** Isolement, identification and cultivation of endophytic fungi from medicinal plants for the production and characterization of bioactive fungal metabolites. University of Karachi. Departement of microbiology. Pakistan, 59-62 p.
- [20]. **Xiaoling C., Xiaoli L., Shining Z., Junping G., Shuiping W., Xiaoming L., Zhigang S. & Yongcheng L. (2010).** Cytotoxic and topoisomerase I inhibitory activities from extracts of endophytic fungi isolated from mangrove plants in Zhuhai, China. *Journal of Ecology and The Natural Environment.* 2 : 017-024.
- [21]. **Choudhary M.I., Musharraf T., Shaheen F., Ali S., Atta-ur R. & Naturforsch Z.C. (2004).** Isolation of bioactive compounds from *Aspergillus terreus*. *Journal of Bioscience.* 59 : 324-327.
- [22]. **Mohanta J., Tayung K. & Mohapatra U. (2008).** Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three Ethnomedicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India. *The Internet Journal of Microbiology.* (5) 2.
- [23]. **Ladjal S. (2012).** Activité antimicrobienne des métabolites secondaires des champignons endophytes isolés du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) de la région de M'sila. Université de Sétif. Département d'écologie et biologie végétale. Algérie, p. 44-45.

- [24]. Shweta S., Khadabadi S. & Ganesh T.G. (2012). *In vitro* antimitotic, antiproliferative, DNA fragmentation and anticancer activity of chloroform and ethanol extract of *Revia hypocrateriformis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. S503-S506.
- [25]. Glinska S., Bartzak M., Oleksiak S., Wolska A., Gabara B., Posmyk M. & Janas K. (2007). Effects of anthocyanin-rich extract from red cabbage leaves on meristematic cells of *Allium cepa*. Roots treated with heavy metals. *Ecotoxicology and environmental safety*. 68 : 343-350.
- [26]. Fasla B. (2009). Evaluation du potentiel antimitotique et génotoxique de plantes médicinales et analyse phytochimique. Université d'Oran Es-sénia. Faculté des sciences. Département de biologie. Algérie, p. 42-64.
- [27]. Ikeda K., Pant B., Mishiro A., Ozawa K., Masujina T. & Sugiyana M. (2000). A convenient method for the evaluation of anti-tumor agents affecting the cell cycle. *Jornal of bioscience and bioengineering*. 90 (5) : 574-576.
- [28]. Subhadradevi V., Khairunissa K., Asokkumar K., Umamaheswari M., Sivashanmugam A. & Jagannath P. (2011). Induction of apoptosis and cytotoxic activities of *Apium graveolens* Linn. using *in vitro* models. *Middle-East J Sci Res*. 9 : 90-94.
- [29]. Channabasava. & Melappa G. (2014). First report of anticancer agent, lapachol producing endophyte, *Aspergillus niger* of *Tabebuia argentea* and its *in vitro* cytotoxicity assays, *Bangladesh J Pharmacol*, 9 : 129-139.
- [30]. Kuras M., Nowakowska J., Sliwinska E., Pilarski R., Ilasz R., Tykarska T., Zobel A. & Gulewicz K. (2006). Changes in chromosome structure, Mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium* test induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC., *J. Ethnopharmacol*. 107 (2) : 211-221.
- [31]. Levan A. (1938). The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. *Hereditas*. 24 : 471-486.
- [32]. Verdier-Pinard P., Lansiaux A. & Bailly C. (2001). Combretastatin A4 phosphate. *Bulletin du cancer*. 88 (3) : 235-239.
- [33]. Garrett R.H. & Grisham C.M. (2000). Biochimie. De boeck université édition, p. 1950-1962.
- [34]. Thenmozhi A. & Mahadeva Rao U.S. (2011). Evaluation Of Antimitotic Activity Of *Solanum Torvum* Using *Allium Cepa* Root Meristematic Cells And Anticancer Activity Using MCF-7- Human Mammary Gland Breast Adenocarcinoma Cell Lines. *Drug Invention Today*. 3 (12) : 290-296.
- [35]. Stierle A., Strobel G.A. & Stierle D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*. 260 : 214-216.
- [36]. Li J.Y., Stroble G.A., Sidhu R., Hess W.M. & Ford E.J. (1996). Endophytic Taxol producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology*. 142 : 22-26.
- [37]. Visalakchi S. & Muthumary J. (2010). Taxol (anticancer drug) producing endophytic fungi: An overview. *Int J Pharma Bio Sci*. 1 : 1-9.
- [38]. Wuerzberger S.M., Pink J.J., Planch S.M., Byers K.L., Bornmann W.G. & Boothman D.A. (1998). Induction of apoptosis in MCF-7: WS8 breast cancer cells by /3-lapachone1. *Cancer research*, 58: 1876-1885.
- [39]. Marcano L., Carruyo I., Fernandez Y., Montriél X. & Torrealba Z. (2006). Determination of vanadium accumulation in onion root cells (*Allium cepa* L.) and its correlation with toxicity. *biocell*. 30 (2): 259-267.
- [40]. Schulz B., Draeger S., Dela Cruz T.E., Rheinheimer J., Siems K., Loesgen S., Bitzer J., Schloerke O., Zeeck A., Kock I., Hussain H., Dai J. & Krohn K. (2008). Screening strategies for obtaining novel, biologically active, fungal secondary metabolites from marine habitats. *Botanica Marina*. 51 : 219-234.