



**Université Constantine 1**

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

**Département de Microbiologie**

**Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de Master**

**Spécialité : Microbiologie Générale.**

**Option: Biotechnologie des mycètes, fermentation et production de substances fongiques.**

**Impact du plomb ou du cadmium sur la croissance et sur  
quelques systèmes de détoxification d'une souche  
*d'Aspergillus sp.***

**Présenté par :**

**BENABDALLAH IBTISSEM et KOUADRA HAKIMA**

**Soutenu le 25/06/2014**

**Devant le Jury :**

**Président : PR. KACEM CHAUCHE NOREDDINE**

**Encadreur : Mme MOSBAH FAWZIA**

**Tutrice : Melle MEGHNOUS OUISSEM**

**Examinatrice : Mme ABDELAZIZ WIDED**

**Année Universitaire : 2013/2014**



# *Remerciements*

*Avant tout, nous remercions ALLAH Le Tout Miséricordieux, L'unique, Le Puissant, Maître des cieux et de la terre pour nous avoir guidé, protégé, aidé et permis de mener à bien ce travail.*

*C'est avec un grand plaisir que nous réservons ces lignes en signe de gratitude et de reconnaissance à ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail :*

*Notre responsable de formation Madame MOSBAH FAWZIA, Encadreur de notre mémoire. Merci pour son aide, ses conseils, la correction du manuscrit, et pour sa patience, sa confiance, son encouragement, et Son œil critique qui nous a été très précieux pour structurer le travail et pour améliorer la qualité des différentes sections de notre mémoire. Merci pour tout !*

*Nous remercions également chaleureusement M<sup>elle</sup> MEGHNOUS OUISSEM Co-encadreur de notre mémoire pour sa disponibilité, son savoir-faire, ses conseils, elle nous a permis de réaliser la partie pratique dans les meilleures conditions. Sa compétence, sa patience, son enthousiasme et l'attention particulière avec laquelle elle a suivi et dirigé ce travail ont permis son aboutissement à temps.*

*Ensuite nous tenons à remercier les membres du jury Monsieur Le professeur KACEM CHAOUCHE et M<sup>elle</sup> ABDELAZIZ pour avoir pris le temps d'évaluer et de corriger ce mémoire.*

نحمد الله تعالى الذي قدرنا على شرب جرعة ماء من هذا العلم الواسع فالعلم لا يتم إلا بالعمل وان العمل

كالشجرة والعمل به كالشجرة فاهدي ثمرة جهدي التي طالما تمنيت اهدءها وتقديمها

أهدي هذا العمل المتواضع إلى أبي الذي لم يبخل علي يوماً بشيء

وإلى أمي التي ذودتني بالحنان والمحبة

أقول لهم: أنتم وهبتموني الحياة والأمل والنشأة على شغف الاطلاع والمعرفة

وإلى إخوتي وأسرتي جميعاً

ثم إلى كل من علمني حرفاً أصبح سنا برقه يضيء الطريق أمامي

ابتسام



## *Liste des tableaux*

**Tableau 1** : préparation des milieux à différentes concentrations en Pb .....38

**Tableau 2** : préparation des milieux à différentes concentrations en Cd.....38

## *Liste des figures*

<b>Figure 1 :</b> Tableau périodique des éléments de Mendeleïev .....	2
<b>Figure 2 :</b> Modèles hypothétiques des effets d'un stress métallique sur la diversité des communautés microbiennes.....	6
<b>Figure 3:</b> Impact de Pb sur la croissance fongique d' <i>Aspergillus sp</i> sur gélose Czapek-Dox supplémentée en Pb à différentes concentrations.....	21
<b>Figure 4:</b> courbes normalisées de l'impact du Pb sur la croissance fongique d' <i>Aspergillus sp</i> après 96 h sur milieu Czapek-dox supplémenté en Pb à différentes concentrations....	21
<b>Figure 5:</b> Etude microscopique comparative de la souche <i>Aspergillus sp</i> à différentes concentrations en Pb (grossissement $\times 10$ et $\times 40$ )	
<b>Figure 6:</b> Test présomptif de l'impact du Pb sur l'activité catalasique d' <i>Aspergillus sp</i> .....	23
<b>Figure 7:</b> Courbe normalisée de l'impact du plomb sur l'activité catalasique d' <i>Aspergillus sp</i> sur gélose Czapek-dox.....	23
<b>Figure 8:</b> Courbe normalisée de l'impact du plomb sur la teneur en proline d' <i>Aspergillus sp</i> .....	23
<b>Figure 9:</b> Impact de Cd sur la croissance fongique d' <i>Aspergillus sp</i> sur gélose Czapek-Dox supplémentée en Cd à différentes concentrations.....	24
<b>Figure 10:</b> Courbes normalisées de l'impact de Cd sur la croissance fongique d' <i>Aspergillus sp</i> après 96 h sur milieu supplémenté en Cd à différentes concentrations.....	24
<b>Figure 11:</b> Etude microscopique comparative de la souche <i>Aspergillus sp</i> à différentes concentrations en Cd (grossissement $\times 10$ et $\times 40$ ).....	25
<b>Figure 12 :</b> Test présomptif de l'impact du Cd sur l'activité catalasique d' <i>Aspergillus sp</i> sur gélose Czapek –dox.....	26
<b>Figure 13:</b> Courbe normalisée de l'impact du Cadmium sur l'activité catalasique d' <i>Aspergillus sp</i> .....	26
<b>Figure 14:</b> Courbe normalisée de l'impact du cadmium sur la teneur en proline d' <i>Aspergillus sp</i> .....	26
<b>Figure 15 :</b> Observation macroscopique de la souche <i>Aspergillus sp</i> .....	36
<b>Figure 16 :</b> Observation microscopique de la souche <i>Aspergillus sp</i> .....	36
<b>Figure 17 :</b> Impact du Cd sur les caractères cultureux de la souche <i>Aspergillus sp</i> .....	41

## Table de matières

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : synthèse bibliographique .....</b>	<b></b>
<b>I. Les métaux lourds .....</b>	<b>3</b>
I.1.Généralités sur les métaux lourds .....	3
I.2. Plomb.....	3
I.3.Cadmium.....	4
I.4.Antimoine .....	5
<b>II .Les différentes sources de métaux lourds dans l'environnement</b>	<b>5</b>
II .1.Source naturelle .....	6
II .2.Source Anthropique .....	6
<b>III. Impact des métaux lourds sur les mycètes .....</b>	<b>6</b>
III . 1 . toxicité des métaux lourds pour les mycètes .....	7
III . 2 . résistances des souches fongiques aux métaux lourds.....	9
III. 2. 1 . tolérance .....	9
III. 2 .2 .résistance .....	10
III. 3 . mécanismes de résistance .....	10
III. 3 .1. immobilisation du métal.....	10
III. 3. 1.1. L'absorption .....	11
III. 3 . 1. 2. La bioaccumulation .....	12
III. 3 .1. 3. Précipitation de composés métalliques sur des hyphes .....	13
III.3. 2 .La biotransformation .....	13
III.3. 2 .1 .l'oxydoréduction .....	13
III . 3. 2 .2.La biométhylation.....	14
III . 3 .3 . la solubilisation .....	14
III . 3.4.Les système de détoxification anti-oxydatif .....	15
III .3.4.1. Les Systèmes antioxydants enzymatiques .....	16.
a. les superoxydes dismutases.....	16.
b. les catalases.....	16

d. les peroxydases .....	16
III . 3 .4. 2.les composés de détoxification .....	17
<b>Chapitre II : matériel et méthodes .....</b>	<b>19</b>
<b>I. objectifs .....</b>	<b>19</b>
<b>II. Description de la souche testée.....</b>	<b>19</b>
<b>III. Impact du plomb ou du cadmium .....</b>	<b>19</b>
III.1. Sur la croissance fongique.....	19.
III.2. Sur les caractères cultureux et morphologiques.....	20.
III.3. Sur l'activité de la catalase.....	20
III.4. Sur la teneur en proline.....	21.
<b>Chapitre III : résultats et interprétation .....</b>	<b>22</b>
<b>I . Impact du plomb .....</b>	<b>22</b>
I.1.Sur la croissance fongique .....	22
I.2. Sur les caractères cultureux et morphologiques de la souche fongique.....	23
I.3. Sur l'activité de la catalase. ....	24
I.4. Sur la teneur en proline.....	24
<b>II . Impact du Cadmium.....</b>	<b>25</b>
II.1.Sur la croissance fongique .....	25
II.2. Sur les caractères cultureux et morphologiques de la souche fongique.....	25
II.3.Sur l'activité de la catalase .....	27.
II.4. Sur la teneur en proline .....	27
<b>Conclusion .....</b>	<b>28</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>29</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>36</b>

# *Introduction*

Au cours des dernières années, la pollution par les métaux lourds est devenue l'un des problèmes environnementaux les plus graves [1].

A long terme, une pollution va modifier l'écosystème et donc la dominance des espèces en son sein. En terme de population, on observe des disparitions, des diminutions voire même des apparitions de certaines espèces [2].

Les métaux lourds tels que le plomb, le cadmium, le cuivre, le zinc, et le mercure ne peuvent pas être biodégradés et donc persistent dans l'environnement pendant de longues périodes. De plus ils sont continuellement rajoutés dans les sols par diverses activités : en agriculture par l'application de boues d'épuration ou dans l'industrie métallurgique [3].

Ces métaux sont souvent toxiques à faible concentration et les microorganismes sont les premiers organismes influencés par cette toxicité [4].

De nombreux auteurs ont signalé que la présence de métaux lourds diminuait la biomasse microbienne soit directement soit en inhibant certaines propriétés biochimiques du sol indispensables à sa survie. Cependant l'action des métaux est souvent spécifique, certains microorganismes résistants peuvent survivre à un stress environnemental extrême, alors que d'autres plus sensibles disparaissent en présence de ces nouvelles contraintes [2].

De nombreuses recherches ont étudié les effets d'un ou de plusieurs composés métalliques sur les croissances des champignons et des bactéries. Ainsi plusieurs travaux ont été réalisés au laboratoire de Biologie et environnement de l'université Constantine 1.

Dans ce cadre l'impact de l'antimoine ou du Chrome sur la croissance d'*Aspergillus*, de *Rhizopus*, de *Glomus* et de *Fusarium* isolés des rhizosphères des deux plantes steppiques (*Hedysarum pallidum* et *Lygeum spartum*) a été étudié [5].

D'autres travaux se sont intéressés à l'impact des métaux lourds sur les systèmes antioxydants enzymatiques (les superoxydes dismutases, les catalases, les peroxydases) et la teneur en proline qui sont des systèmes de défense très efficaces et qui jouent un rôle très important lors de la détoxification des sols pollués par les métaux lourds.

Notre travail a été mené pour établir la toxicité de Plomb ou Cadmium à différentes concentrations sur la croissance et sur quelques systèmes de détoxification d'*Aspergillus sp.*

Notre mémoire comprend trois chapitres :

**Le chapitre I** est une synthèse bibliographique qui rassemble des données générales sur l'impact des métaux lourds sur la croissance fongique et sur leur degré de toxicité. Des mécanismes de résistance fongique à quelques métaux lourds y sont décrits.

**Le chapitre II** donne une description des protocoles expérimentaux utilisés d'une part pour l'étude de toxicité du Plomb ou du Cadmium sur la croissance fongique à différentes concentrations sur la souche fongique *Aspergillus sp* et d'autre part pour l'étude de l'impact de ces métaux sur l'activité de la catalase ainsi que sur la production de la proline.

**Le chapitre III** est consacré à la présentation des résultats obtenus et à leur interprétation. Tout en montrant l'influence du Plomb ou du Cadmium sur la croissance, la morphologie, l'activité enzymatique et protéique de la souche *Aspergillus sp*, nos résultats mettent en évidence la toxicité plus importante du Cadmium par rapport à celle du plomb et les limites des systèmes de détoxification lorsque les concentrations métalliques sont élevées.

## *Chapitre I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE*



<b>IA</b>										<b>D</b>													
1 1.0079 H HYDROGENE																	2 4.0026 He HELIUM						
<b>IIA</b>																		<b>IIIA</b> <b>IVA</b> <b>VA</b> <b>VIA</b> <b>VIIA</b>					
3 6.941 Li LITHIUM	4 9.0122 Be BERYLLIUM																	5 10.811 B BOR	6 12.011 C CARBONE	7 14.007 N AZOTE	8 15.999 O OXYGENE	9 18.998 F FLUORE	10 20.180 Ne NEON
11 22.990 Na SODIUM	12 24.305 Mg MAGNESIUM	<b>IIIB</b>	<b>IVB</b>	<b>VB</b>	<b>VIB</b>	<b>VII B</b>	<b>VIII B</b>			<b>IB</b>	<b>IIB</b>	13 26.982 Al ALUMINIUM	14 28.086 Si SILICIUM	15 30.974 P PHOSPHORE	16 32.065 S SULFURE	17 35.453 Cl CHLORRE	18 39.948 Ar ARGON						
19 39.098 K POTASSIUM	20 40.078 Ca CALCIUM	21 44.956 Sc SCANDIUM	22 47.867 Ti TITANE	23 50.942 V VANADIUM	24 51.996 Cr CHROME	25 54.938 Mn MANGANESE	26 55.845 Fe FER	27 58.933 Co COBALTE	28 58.933 Ni NICKEL	29 63.546 Cu CUIVRE	30 65.38 Zn ZINC	31 69.723 Ga GALLIUM	32 72.64 Ge GERMANIUM	33 74.922 As ARSENIC	34 78.96 Se SELENIUM	35 79.904 Br BROMRE	36 85.36 Kr KRYPTON						
37 85.468 Rb RUBIDIUM	38 87.62 Sr STRONTIUM	39 88.906 Y YTIUM	40 91.224 Zr ZIRCONIUM	41 92.906 Nb NIOBIUM	42 95.94 Mo MOLYBDENE	43 (98) Tc TECHNETIUM	44 101.07 Ru RUTHENIUM	45 101.07 Rh RHODIUM	46 106.42 Pd PALADIUM	47 107.87 Ag ARGENT	48 112.41 Cd CADMIUM	49 114.82 In INDIUM	50 118.71 Sn ETAIN	51 121.76 Sb ANTIMOINE	52 127.6 Te TELURE	53 126.905 I IODE	54 131.29 Xe XENON						
55 132.94 Cs CESIUM	56 137.33 Ba BARYUM	57-71 La-Lu LANTHANOIDES	72 178.49 Hf HAFNIUM	73 180.95 Ta TANTALE	74 183.84 W WOLFRAME	75 186.21 Re RHENIUM	76 186.21 Os OSMIUM	77 193.22 Ir IRIDIUM	78 195.08 Pt PLATINE	79 196.97 Au OR	80 200.59 Hg MERCURE	81 204.38 Tl THALLIUM	82 207.2 Pb PLOMB	83 208.98 Bi BISMUTH	84 (209) Po POLONIUM	85 (210) At ASTATRE	86 (222) Rn RADON						
87 (223) Fr FRANCIUM	88 (226) Ra RADIUM	89-103 Ac-Lr ACTINOIDES	104 (261) Rf RUFORMIUM	105 (262) Db DUBNIUM	106 (263) Sg SEBORGIUM	107 (264) Bh BOHRIUM	108 (277) Hs HASSIUM	109 (265) Mt MOSCOVIUM	110 (261) Uu UNUNBIUM	111 (272) Uu UNUNTRIUM	112 (285) Uu UNUNBIUM												

Figure1 : Tableau périodique des éléments de Mendeleïev [2].

Les lignes violettes délimitent les métaux des métalloïdes et non métaux. Les métaux avec un fond turquoise sont souvent des polluants des écosystèmes et peuvent être toxique pour l'homme et son environnement[2].

# **I .Les métaux lourds**

## **I.1.Généralité sur les métaux lourds**

La classification périodique des éléments chimiques selon Mendeleïev regroupe des métaux et des non métaux. Ces deux groupes présentent des propriétés physiques et chimiques différentes.

D'un point de vue physique, le terme « métaux lourds » désigne les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes (environ 65 éléments), caractérisés par une forte masse volumique supérieure à  $5 \text{ g/cm}^3$  [3] , et de numéro atomique élevé et présentant un danger pour l'environnement et pour l'homme [4].

Ces éléments peuvent être classés en différents groupes sur la base de leurs caractéristiques telles que les fonctions et les propriétés électrochimiques[4].

D'un point de vue chimique, les métaux sont d'excellents conducteurs électriques et participent aux réactions sous forme de cations [2] .

D'un point de vue biologique, on en distingue deux types en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques : les métaux essentiels et les métaux toxiques [3].

Les métaux essentiels sont des éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires et se trouvent en proportion très faible dans les tissus biologiques .Certains peuvent devenir toxiques lorsque la concentration dépasse un certain seuil. C'est le cas du cuivre (Cu), du nickel (Ni), du zinc (Zn), du fer (Fe) [3] .

Les métaux toxiques ont un caractère polluant avec des effets toxiques pour les organismes vivants même à faible concentration. Ils n'ont aucun effet bénéfique connu pour la cellule [3] .

Les métaux lourds sont les polluants les plus fréquemment rencontrés dans les sols pollués. Ils constituent une menace pour l'environnement et peuvent représenter des risques pour la santé difficiles à évaluer [6] .

Les métaux toxiques sont nombreux, mais on peut citer surtout l'arsenic, le cadmium, le plomb et le mercure. Ils ont des impacts sur les végétaux, les produits de consommation courante, sur l'homme et les microorganismes [7].

## **I.2. Le plomb**

Le plomb, élément du groupe IV-A du tableau périodique des éléments de Mendeleïev (figure1), de masse atomique 207,2 g/mol, possède une densité élevée de 11,3 g.cm<sup>-2</sup>. Il possède un point de fusion de 327°C et sa température d'ébullition est d'environ 1700°C. Il est difficilement détruit, et non dégradable [3] .

Le plomb est l'un des métaux toxiques présent en grande abondance dans la croûte terrestre (hydrosphère, atmosphère, sol...), La concentration moyenne est approximativement de 20 ppm. Il existe plusieurs isotopes stables de plomb dans la nature, les plus abondants sont : 208Pb, 206Pb, 207Pb et 204Pb [8].

Ce métal est en réaction avec de nombreux composés inorganiques (sulfates, nitrates, carbonates, chlorure...) soit dans les minéraux soit dans les sols [8].

Le plomb a été largement employé depuis des siècles à travers le monde pour sa facilité d'extraction, sa malléabilité, son bas point de fusion. Il est actuellement le 5<sup>ème</sup> métal le plus communément utilisé dans le monde [4]. Il a été largement utilisé pour la fabrication de batteries d'accumulateurs. Le minium de plomb a longtemps été le matériau de choix pour protéger les pièces de fer ou de fonte de la corrosion [9].

Le Pb est un des polluants métalliques les moins mobiles dans le sol. Il s'accumule dans l'environnement, n'est pas biodégradable et ne perd pas de sa toxicité avec le temps. Il est très toxique pour l'homme [10] . Ses effets nocifs incluent des dommages sur le système nerveux, la reproduction, le système rénal, le flux sanguin, l'altération de la synthèse de l'hémoglobine, entre autres. Certains dérivés inorganiques du plomb sont également considérés comme cancérigènes probables pour l'homme .Le Pb est classifié dans le Groupe 2A par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) [9].

## **I.3. Le cadmium**

Le cadmium est un élément naturel présent dans la croûte terrestre à concentration moyenne de 0.2 partie par million .C'est un métal blanc argent, légèrement bleuté [11]. Ce métal de formule chimique Cd du groupe IIB du tableau périodique des éléments de

Mendeleïev (figure1) , appartenant à la famille des métaux de transition, ayant des propriétés physiques très proches du zinc [12] [13].

Le cadmium est toxique dans l'environnement et même très toxique sous toutes ses formes (métal, vapeur, sels, composés organiques). La toxicité du cadmium a été observée sur des microbes et des champignons du sol, des insectes, des micro-organismes aquatiques [14] .

Le cadmium fait également partie des métaux lourds les plus dangereux pour l'Homme. Même à de faibles concentrations, il tend à s'accumuler dans le cortex rénal sur de très longues périodes (50 ans) [15].

Le Cd est classé comme un cancérogène chez l'Homme (groupe 1) par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) [16]. De nombreuses études ont démontré que ce métal peut induire de multiples cancers au niveau des reins, des poumons, des testicules ou de la prostate [13].

#### **I.4. L'Antimoine**

L'antimoine est l'élément chimique métallique de symbole Sb (du latin *stibium*), de numéro atomique 51. C'est un solide brillant de couleur argentée [17]. Dans la classification périodique des éléments (voir figure 1), l'antimoine se situe dans la cinquième colonne entre l'arsenic (As) et le bismuth (Bi) dont il possède certaines de leurs propriétés. Comme l'arsenic, l'antimoine peut former des composés dont le degré d'oxydation va de -3 à +5 [18].

L'antimoine est peu abondant sur Terre (0,7 % dans l'écorce terrestre) et est surtout exploité à l'état de sulfure sous forme de stibine ou stilbine. Parfois il se trouve à l'état natif [19].

L'antimoine et ses composés sont classés dans la liste des polluants prioritaires en Europe et aux États-Unis .La concentration maximale admissible dans les eaux de boisson a été fixée respectivement à 5 et à 6 µg/l par la Commission européenne et l'USEPA [19]. L'antimoine n'a semble t-il que des effets néfastes, c'est donc un élément trace toxique [17].

Enfin, à l'heure actuelle, aucune fonction biologique de l'antimoine n'a été démontrée [18].

## **II. Les différentes sources de métaux lourds dans l'environnement**

Le problème principal avec les métaux lourds comme le plomb, le cadmium, le cuivre et le mercure est qu'ils ne peuvent pas être biodégradés, et donc persistent pendant de longues périodes dans des sols [3].

Une quantité importante de ces métaux lourds est introduite dans l'environnement par l'intermédiaire de sources naturelles et humaines [20].

### **II .1.Source naturelle**

Les métaux lourds sont présents naturellement dans les roches, ils sont libérés lors de l'altération de celles-ci pour constituer le fond géochimique [7]. La concentration naturelle de ces métaux lourds dans les sols varie selon la nature de la roche, sa localisation et son âge [3].

Les métaux lourds sont toujours présents dans le sol, dans l'eau souterraine et dans l'eau de surface. Les concentrations naturelles dans le sol se situent généralement dans une plage de 1 à 100 mg/kg, mais des valeurs inférieures ou supérieures sont possibles pour certains métaux [21].

### **II .2.Source Anthropique**

Les métaux ont été et sont encore largement présents dans un grand nombre d'activités industrielles et domestiques (origine anthropique) et constituent la source majeure de contamination [7]. De nos jours, plusieurs activités humaines ont conduit à une augmentation de la pollution par les métaux lourds [2].

Ainsi les domaines les plus polluants sont :

- L'agriculture avec l'utilisation massive des engrais (avec leur impuretés), des pesticides, de l'épandage de boues d'épuration, des lisiers.
- L'industrie et ses rejets de poussières contenues dans les fumées émises, ou ses rejets d'effluents gazeux ou liquides.
- L'urbanisation et ses décharges de déchets urbains, l'augmentation de la circulation automobile et de la combustion de sources d'énergie fossile [2].

- Les déchets miniers et les terrils industriels qui sont une source particulièrement importante de pollution par le zinc, le plomb et le cadmium [3].

### **III. Impact des métaux lourds sur les mycètes**

Les contaminations métalliques peuvent impacter la structure des communautés fongiques et bactériennes du sol [22]. Lorsque des concentrations toxiques en métaux lourds sont atteintes dans un environnement, la biodiversité de la communauté microbienne est modifiée [23].

Les impacts des métaux lourds sur les communautés microbiennes peuvent être abordés de diverses façons : la densité (colonie forming units, CFU), la taille, la structure des communautés (génétique et fonctionnelle) et également l'activité enzymatique [3].

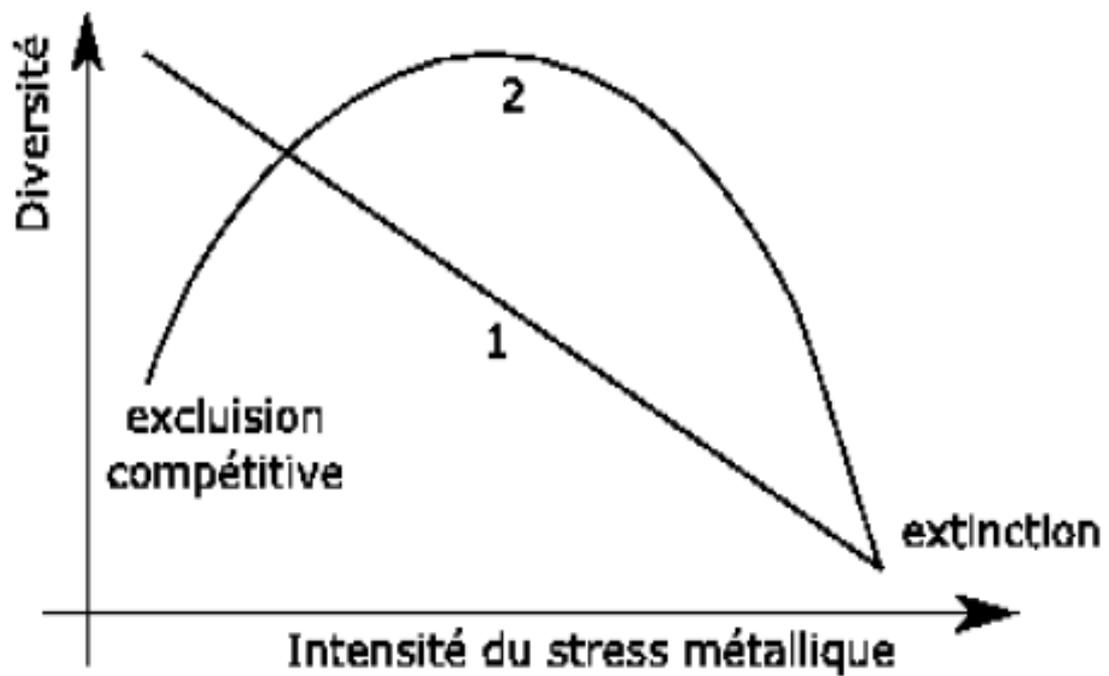
En règle générale, les pollutions métalliques réduisent la diversité et l'abondance des espèces fongiques, notamment en exerçant une pression de sélection favorisant les populations tolérantes [2]. On observe une diminution de la biodiversité des organismes du sol (même ceux dont l'utilité n'est pas encore connue) et une augmentation des populations tolérantes [24]. Les champignons des principaux groupes taxonomiques sont retrouvés sur des sites pollués et sont capables d'y croître normalement [2].

On peut modéliser la relation entre la diversité des micro-organismes et un stress métallique par deux modèles (figure 2) :

- les effets d'un stress de plus en plus intense conduisent à une diminution de la diversité microbienne (droite).
- Un stress modéré permet une domination des espèces bien adaptées, et donc une faible diversité. L'augmentation de l'intensité du stress peut défavoriser ces espèces et permettre à d'autres de proliférer. Au-delà d'un certain seuil, l'intensité du stress est trop importante, cela conduit à l'extinction des organismes et une diminution de la diversité (courbe) [2].

De nombreuses études montrent une diminution du potentiel de croissance des champignons sur du milieu contaminé [24].

Une inhibition de l'assimilation de l'azote chez *Penicillium involutus* est causée par la présence de métaux lourds. Des changements dans la mobilité et la forme des mitochondries et vacuoles dus à de fortes concentrations en zinc [24].



Les effets biochimiques se manifestent par l'inhibition de l'activité de certaines enzymes de respiration des cellules, et de la synthèse d'ARN et des protéines [25].

### **III. 1. Toxicité des métaux lourds pour les mycètes**

Une substance est dite toxique lorsque mise en contact avec un organisme vivant, elle peut entraîner chez lui une réaction spécifique ou un stress compromettant la réalisation de ses fonctions physiologiques au point d'avoir des effets néfastes sur lui même et sur sa descendance [4].

Tout élément est toxique quand il est absorbé en excès par rapport à la capacité d'assimilation de l'organisme [10] .

La toxicité d'un métal dépend de sa spéciation (forme chimique) autant que des facteurs environnementaux [3] .

Les effets toxiques des métaux sont dus à leur grande capacité à se fixer sur les atomes d'oxygène, d'azote et de soufre et surtout sur les résidus cystéine inhibant ainsi l'activité de nombreuses enzymes. Cette inhibition se fait par le blocage de groupes fonctionnels de molécules biologiques importantes, par le déplacement et/ou le remplacement d'ions essentiels dans les biomolécules, par le changement conformationnel, la dénaturation et l'inactivation d'enzymes et la rupture de tous types de membranes cellulaires [24].

Dans le sol, les métaux lourds peuvent exister sous forme d'ion libre ou sous forme liée à des particules de sol. Cependant, un métal n'est toxique pour les organismes vivants que s'il est sous forme libre ; il est alors biodisponible [3] .

La biodisponibilité des métaux est, en premier lieu, liée à leur spéciation et à leur répartition dans les phases solides et liquides des sols. Cette spéciation est dépendante des caractéristiques physico-chimiques des sols [22].

La toxicité des métaux lourds pour un même organisme dépend du type de sol, de sa disponibilité de chaque minéral dans ce sol et de l'état physiologique du micro-organisme [10].

La toxicité des métaux lourds n'est pas un processus absolu mais dépend de plusieurs paramètres et phénomènes [4].

Parmi lesquels, la capacité d'échange de cation (CEC), le PH, le potentiel redox (Eh), la teneur en phosphate disponible, la teneur en matière organique, les activités biologiques [3] .

Le pH est un facteur important influençant la solubilité et la spéciation du métal et donc sa toxicité [4]. Quand le pH diminue d'une unité, la concentration des cations métalliques libres augmente d'environ un facteur 2 dans la solution de sol et par conséquent améliore la phyto-extraction [3].

D'une manière plus générale, le pH influence les conditions d'oxydoréduction du sol, affectant ainsi les mécanismes d'absorption-désorption ou de précipitation- dissolution qui en dépendent. Une acidification du sol entraîne un déplacement des métaux de la phase solide du sol (désorption) vers sa phase aqueuse (dissolution). Cette tendance est plus ou moins forte selon le métal considéré, et sera par exemple plus forte pour le cadmium que pour le zinc et le plomb [22].

Les travaux de BACHICH et STOTZSKY (1977 ; 1979) sur les effets du pH sur la sensibilité au Cd de plusieurs bactéries, des actinomycètes et des champignons ont montré que la toxicité du Cd décroît à pH alcalin pour la plupart des microorganismes testés et la toxicité du Pb chez les champignons diminue quand le pH augmente de 5 à 9 . La faible toxicité à pH alcalin est plutôt liée à la formation de  $Pb OH^+$  qui est moins toxique que la forme libre  $Pb^{2+}$  [4].

### **III. 2. Résistance des souches fongiques aux métaux lourds**

La survie d'organismes en présence de métaux toxiques dépend principalement de leurs propriétés biochimiques et structurales intrinsèques, ainsi que de leur adaptation physiologique et/ou génétique. Cette survie n'est possible, en effet, que par la mise en jeu de mécanismes de tolérance aux métaux lourds, Après avoir défini les termes de résistance et de tolérance, nous détaillerons ces différents mécanismes [26].

#### **III.2.1.La tolérance**

La "tolérance" à un métal peut être définie comme la capacité d'un organisme à survivre à la toxicité des métaux par le moyen de propriétés intrinsèques (possession de parois cellulaires pigmentées imperméables, ...) et/ou de la modification de la toxicité par des paramètres environnementaux [26].

Les champignons révèlent une très grande tolérance vis-à-vis des métaux lourds et deviennent des organismes dominants dans certains habitats pollués. Les mélanines qui sont des pigments sombres situés dans la paroi de cellule fongique (mais également peuvent exister sous forme de polymères extracellulaires) peuvent réduire l'effet toxique de métaux lourds grâce à la présence de différents groupes [27].

Des études ont montré des variations génétiques aux niveaux interspécifiques pour des champignons ectomycorrhiziens tolérants au Cd [28].

Les champignons des sites métalliques pollués ont révélé une très grande tolérance du métal et une capacité de bioadsorption de chrome et de cadmium [29].

Les champignons tels que *Rhizopus stolonifer*, *Trichoderma viride*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium conglutinans*, *Cunninghamella echinulata*, *Aspergillus* et *Penicillium* ont toléré des concentrations élevées en cadmium (100-250 ug) [30].

*Aspergillus niger* a le plus toléré des concentrations en Pb (CMI 600mg /L) par rapport à *Aspergillus flavus*, *Fusarium solani*, *penicillium chrysogenum* [27].

### III.2.2.La résistance

Le terme de "résistance" peut être défini comme la capacité d'un organisme à survivre aux effets toxiques des métaux par la mise en œuvre d'un mécanisme de détoxification en réponse directe à l'élément métallique concerné (synthèse de métallothionéines par exemple) [25].

La résistance aux métaux lourds dans un environnement donné dépend des types microbiens, des genres et des espèces testées [4].

Les champignons filamenteux isolés appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Geotrichum* sont résistants à de fortes concentration en Pb, Cr, Cu et Zn [31].

Les souches de levures comprenant les genre *Candida* et *Rhodospiridium* isolées de milieux contaminés par le Cr sont résistantes à de fortes concentrations en chromate par

rapport à *Saccharomyces cerevisiae*, qui est plus sensible. Et chez certaines espèces de *Candida* et *Rhodospiridium*, le mécanisme général de la résistance au chromate est lié à l'absorption d'ions réduit, plutôt pour la réduction biologique de Cr (VI) en Cr (III) [32].

### **III .3.Mécanismes de résistance**

Les micro-organismes doivent développer des mécanismes de résistance contrebalançant l'effet des hautes concentrations en métaux lourds tout en assurant le maintien du rôle biologique des ions essentiels[34].Pour cela ils peuvent limiter l'accumulation des métaux dans les cellules (exclusion), stocker l'élément toxique dans les vacuoles (chélation et séquestration) et/ou activer les systèmes antioxydants (protéines de réponse au stress) [35].

#### **III.3.1.L'immobilisation du métal**

Des éléments toxiques en métal comprenant des radionucléides peuvent être liés, accumulés, et précipités par des mycètes. Les mycètes peuvent agir en tant que récepteurs du métal par absorption, bioaccumulation et précipitation de composés métalliques sur des hyphes [2].

##### **III .3.1.1.L'absorption**

L'absorption signifie que les ions toxiques entrent dans la cellule alors que l'efflux décrit l'expulsion de ces ions par la cellule [4].

Les métaux sont directement absorbés par les micro-organismes en fonction de leurs besoins nutritifs .Les champignons absorbent des métaux en deux phases (active et passive) dépendantes ou indépendantes du métabolisme de la cellule [25].

Les interactions physico-chimiques entre les métaux et la biomasse microbienne porte le nom de "biosorption». La paroi des cellules fongiques joue un rôle de protection et agit telle une barrière contrôlant l'absorption des solutés (essentiels et/ou toxiques) dans la cellule et modifie indirectement la composition ionique intracellulaire en interagissant avec

l'état hydrique de la cellule donc la fixation directe des métaux par les champignons se produit dans certains cas au niveau des parois [27].

La paroi des champignons filamenteux (constituée d'une série de couches de biopolymères glucidiques comme la chitine le chitosane, les glycanes, les polyuronides, les mannanes, les celluloses) porte de nombreux groupements anioniques, véritables pièges des cations métalliques [25].

Il apparaît que la biosorption des métaux sur les parois cellulaires fongiques est un phénomène complexe faisant appel à différents composants et différents mécanismes [36].

L'absorption des métaux lourds par les champignons est conditionnée par de nombreux facteurs physico-chimiques tels que le pH, la température, la matière organique, la nature des cations et des anions [30].

La connaissance des mécanismes d'absorption des métaux (essentiels ou non) a énormément progressé ces dernières années, notamment grâce à la complémentation fonctionnelle de souche de levures déficientes. Ainsi de nombreux transporteurs de métaux ont pu-être clonés et caractérisés notamment chez la levure [2].

Un groupe de transporteurs appartenant à la famille ZIP (*ZRT*, *IRT* related Protein) est impliqué dans l'absorption de  $Fe^{+}$  et de  $Zn^{2+}$  chez *Saccharomyces cerevisiae*. Les homologies de séquences ont permis l'identification de ZRT1 et ZRT2. Ces deux protéines sont des transporteurs de zinc à forte et faible affinités, respectivement [2].

La sorption des métaux a été rapide (< 30 min) due principalement à l'adsorption passive. L'adsorption était la plus élevée dans une communauté de *Glomus mosseae* tolérante aux métaux lourds isolée à partir d'un sol traité avec des boues contaminées par des métaux lourds, elle est capable d'adsorbé jusqu'à 0,5 mg de Cd par mg de biomasse sèche, ce qui correspond 3 fois la capacité de liaison de champignons non-tolérants, et de 10 fois plus élevée pour *Rhizopus arrhizus* [37].

Plusieurs études ont montré une corrélation entre une absorption réduite de Cu et la tolérance au Cu. Des souches de levures résistantes aux métaux lourds montrent une absorption diminuée du Cu, Cd et Li. Cependant, ce phénomène de tolérance accrue due à une absorption réduite de métaux, n'est pas une caractéristique universelle [27].

### **III .3.1.2.La bioaccumulation**

La bioaccumulation désigne la capacité des organismes à absorber et concentrer dans tout ou une partie de leur organisme, certaines substances chimiques, éventuellement rares dans l'environnement (oligoéléments utiles ou indispensables, ou substances toxiques indésirables) [14].

La bioaccumulation des métaux lourds et d'autres composés chimiques est un phénomène, qui a pour conséquence une concentration en polluant dans un organisme vivant supérieurs à la concentration de ce polluant dans le biotope de l'organisme [20].

Les champignons sont des bioaccumulateurs d'éléments traces métalliques (ETM) et en ce sens peuvent parfois être utilisés pour caractériser la pollution d'un site [38].

La bioaccumulation par des champignons vivants est un système auto-renouvelable par la croissance des micro-organismes. Dans ce système, on a la possibilité d'immobiliser des métaux par la modification chimique, par le transport intracellulaire, à l'aide de la dégradation enzymatique des composés organométalliques ou encore par la synergie de plusieurs micro organismes [27].

Les champignons sont capables d'accumuler du Cd dans leurs carpophores en quantité variable suivant l'espèce (jusqu'à  $5.7 \mu\text{g/g}^2$  de poids sec pour *Suillus luteus*). Des études ont montré que le rapport de concentration en Cd dans la biomasse fongique divisée par celle du sol peut varier de 2 à 1000 suivant l'espèce (maximum pour *Amanita muscaria*) [39].

*Agaricus bisporus* possède la capacité de bioaccumuler sept métaux lourds (Pb, Cd, Hg, Fe, Cu, Mn, Zn) [40].

### **III .3.1.3.La précipitation de composés métalliques sur des hyphes**

En ce qui concerne la fixation des ETM, la paroi des hyphes mycéliennes fonctionne un peu comme une résine échangeuse d'ions en libérant des protons et en captant des cations [38].

Lorsqu'un ascomycète formant des mycorhizes éricoïdes est traité avec des concentrations en Zn, des changements dans la morphologie des hyphes peuvent se produire

.De plus observe également des gonflements apicaux et une augmentation des branchements dans les régions subapicales, ainsi qu'une augmentation significative de la quantité de chitine dans les hyphes traités aux métaux [34].

### **III.3. 2. La biotransformation**

Les champignons, ainsi que d'autres organismes, peuvent effectuer des transformations chimiques des métaux par oxydation, réduction, méthylation [27].

Le but de ces transformations est souvent la neutralisation de la toxicité du métal visé soit directement (le métal est ainsi moins ou non toxique après la transformation) soit indirectement en rendant le métal volatil par exemple [2].

#### **III.3. 2.1 .L'oxydoréduction**

Les micro-organismes peuvent mobiliser les métaux, métalloïdes et les composés organométalliques par réduction et processus d'oxydation [41]. Ces réactions visent principalement à protéger l'organisme de l'effet potentiellement toxique des métaux. En ce sens, elles sont donc spécifiques à un microorganisme donné [42].

Plusieurs champignons précipitent les métaux et les métalloïdes aux formes réduites sur les hyphes fongiques. Par exemple, l'argent (I), la réduction en argent élémentaire argent (0). La réduction de mercure (II) pour le mercure volatil (0) peut aussi être induite par des champignons [43].

La réduction de Cr (II) en Cr (I) est un mécanisme potentiel de détoxification et de contrôle de la dispersion du Cr elle peut être réalisée par des champignons tels que *Penicillium fluorescens* et *Aspergillus sp*, isolés sur un sol contaminé et qui ont également montré d'excellentes capacités de biosorption du Cr sur leur paroi [42].

### **III. 3. 2. La biométhylation**

La biométhylation est une réaction chimique qui ajoute un groupement méthyle au métal, principalement Sb ou As ou Hg permettant ainsi sa volatilisation ; elle aurait un rôle de détoxification [36].

La méthylation microbienne de métalloïdes pour donner des dérivés volatils tels que le dimethylselenide ou le triméthylarsine est un phénomène bien connu [43].

La méthylation de l'Hg et d'autres métaux peut être catalysée par de nombreux champignons, et peut être considérée comme un mécanisme de détoxification puisque les espèces méthylées sont souvent plus volatiles et peuvent être relarguées dans l'environnement. [36]

Plusieurs espèces bactériennes et fongiques sont capable de méthylés des composés de l'arsenic comme l'arséniate [As(V),  $ASO_4^-$ ] arsénite [As(III),  $ASO_3^-$ ] et l'acide méthylarsonique ( $CH_3H_2AsO_3$ ) à volatile diméthyl- ( $CH_3$  &  $AP$ ) ou triméthylarsine ( $CH_3$  et  $A$ ) [43].

### **III. 3. 3. La solubilisation**

La solubilisation provient de la production des composés acides tels que les acides carboxyliques, phénoliques, aliphatiques, nitrique et sulfurique [3].

La tolérance en métal et la capacité de solubilisation varie considérablement entre les différents minéraux et des espèces fongiques [44].

La solubilisation au métaux est assurée par le rejet dans le sol de protons(ion  $H^+$ ) et d'agent de complexant organique pouvant agir séparément ou en combinaison .Les composées organiques intervenant dans ce mécanisme font généralement partie de molécules organique de faible masse moléculaire contenant des groupes réactifs carboxyles ou phénols, telles que les acides organiques, les biosurfactants et les sidérophores[45].

Les champignons ont été isolés à partir des roches et du sol contenant le zinc, ils ont été choisis pour leur capacité à solubiliser et transformer trois composés de zinc insolubles :  $ZnO$ ,  $Zn_3(PO)_4$ , et  $ZnCO_3$  [46].

Quatre mécanismes de solubilisation des composés solides métalliques peuvent être observés chez les champignons:

- l'acidolyse (solubilisation des métaux par acidification).
- la complexolyse (complexation des métaux par des acides organiques ou aminés).
- la redoxolyse (par exemple, la réduction de l'ion ferrique provoquée par l'acide oxalique).
- la bioaccumulation, le mycélium fonctionnant comme un lien (les actes de mycelage comme une capture, un emprisonnement des ions métalliques).

Les trois premiers mécanismes se produisent par le moyen des protons et des acides organiques excrétés par les champignons. Le quatrième processus peut être observé si les champignons accumulent un ion métallique provenant de la solution et causent la solubilisation continue de cet ion par la perturbation de l'équilibre entre sa forme solide et sa forme dissoute [47].

### **III .3.4.Système de détoxification anti-oxydatif**

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la destruction par des systèmes de défenses anti-oxydantes [48] .

La production de radicaux libres est induite directement ou indirectement par les métaux [27] .Ces radicaux libres provoquent notamment des dommages sur l'ADN, les protéines cellulaires essentielles et les lipides membranaires (peroxydation lipidique), pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire [49].

Les cellules possèdent des mécanismes de défense endogènes enzymatiques et non enzymatiques appelés antioxydants . De manière générale ces mécanismes suffisent à renverser le stress oxydant, résultant du métabolisme aérobie [49] .

Un antioxydant se définit comme toute substance qui, lorsqu'elle est présente à une faible concentration comparée à celle d'un substrat oxydable, retarde ou prévient significativement l'oxydation de ce substrat [50].

Le système anti-oxydant jouerait un rôle central dans la détoxification des métaux lourds ayant pénétrés dans la cellule. Il est donc important de bien comprendre d'une part les événements conduisant à un stress oxydant et d'autre part les mécanismes biochimiques impliqués dans la réponse à ce stress [51] .

### **III .3.4.1. Systèmes antioxydants enzymatiques**

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces. La catalase, la superoxyde dismutase et certaines peroxydases permettent d'éliminer les Espèces Oxygénées Réactives (EOR) sous forme d'H<sub>2</sub>O [52].

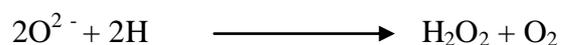
Ces trois activités enzymatiques clefs occupent une place centrale dans les mécanismes de détoxification d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [51].

Les capacités de ces enzymes varient avec l'augmentation de la quantité de métaux dans les cellules, et peuvent dès lors éliminer efficacement les formes réactives de l'oxygène [27] . Une déficience ou une absence de ces composés antioxydants entraînent un stress oxydant [53].

#### **a) Les superoxydes dismutases**

Les Super Oxydes Dismutases (SOD) appartiennent au groupe des oxydoréductases (EC1.15.1.1). Elles sont présentes dans toutes les cellules et sont des enzymes essentielles, pour tout organisme vivant [54].

Le rôle déterminant de la SOD dans les systèmes de défense antioxydante de l'organisme est connu depuis 1968. Le point de départ de la chaîne de production des radicaux libres est l'ion superoxyde (O<sup>2-</sup>). Or, dès ce stade précoce, la SOD inactive cet ion en le transformant en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [48] .



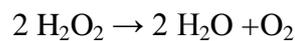
Le peroxyde d'hydrogène est ensuite rapidement catabolisé par la catalase et les peroxydases en dioxygène (O<sub>2</sub>) et en molécules d'eau (H<sub>2</sub>O) [55].

Suite à l'apport de Cu, une augmentation de la capacité de SOD a été mise en évidence chez divers organismes telle que le champignon *Dactylium dendroides* et chez la levure [27].

#### **b) Les catalases**

Les catalases, ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxydoréductases (EC 1.11.1.6), sont des enzymes vitales présentes chez toutes les espèces vivant en aérobiose [57]. Elles sont localisées dans les peroxyosomes [58].

Elles participent à la détoxification de la cellule en catalysant la réaction de dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène gazeux [59].



La structure stable des catalases rend très résistante au pH acide, à la dénaturation thermique et à la protéolyse contrairement à la plupart des autres enzymes [59].

L'activité de la catalase diminue avec l'augmentation des doses de plomb et cadmium dans les sols étudiés. Et de même étude a montré la diminution de l'activité de cette enzyme suite à un traitement par le cadmium chez *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris* et *Helianthus annuus* [60].

La détoxification du chrome par *A. Niger* peut être médiée par un système antioxydant enzymatique telle que la peroxydase, la catalase et de peroxyde d'ascorbate [61].

Une augmentation de l'activité de catalase a également rapporté chez *Aspergillus niger* à la suite de l'augmentation de stress polluant [62].

#### **c) Les peroxydases**

Les peroxydases (POX) (EC 1.11.1.x) sont des enzymes hémoprotéiques de la famille des oxydoréductases, elles sont produites par de nombreux végétaux et microorganismes en faible quantité. Ces enzymes jouent de grands rôles dans la croissance, le développement et le système de défense des plantes et les microorganismes [63].

Les POX permettent comme les catalases, la réduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et en oxygène moléculaire. Cependant, à la différence des catalases, les POX nécessitent la présence d'un substrat particulier pour réaliser leurs activités. Deux types principaux de « molécules

antioxydantes » sont utilisés comme substrat par les peroxydases : l'acide ascorbique (ASC) et le glutathion (GSH). Ces deux molécules participent au cycle « ascorbate/glutathion » [51].

L'induction des peroxydases a été observée dans les feuilles et les racines de nombreuses espèces végétales après l'application de quantités toxiques en Cd, Cu, Ni, Pb, Hg, Zn et Al [27].

### **III. 3.4 .2. Les composés de détoxification**

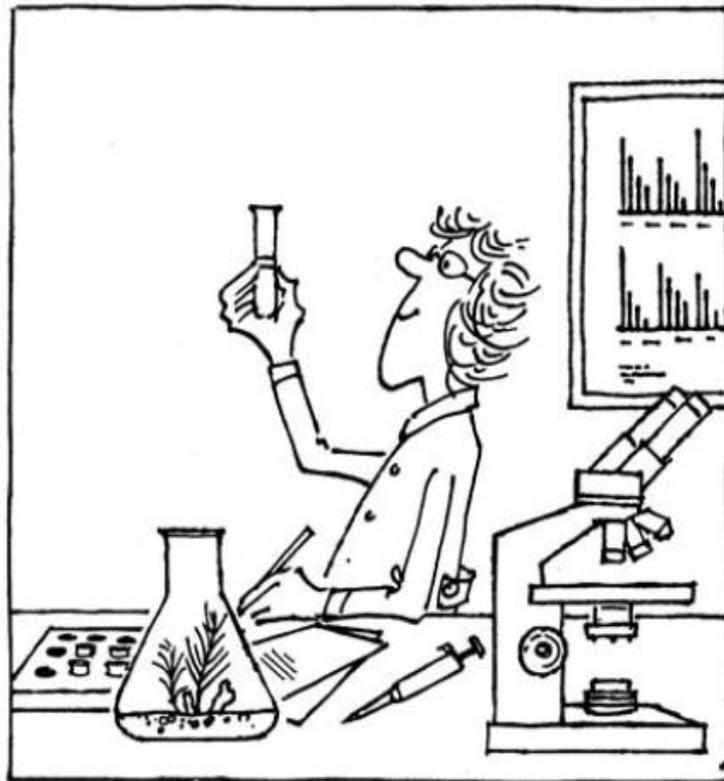
Le mécanisme, par lequel les radicaux libres sont éliminés, fait souvent appel à des composés tels que le glutathion, l'ascorbate, l' $\alpha$ -tocophérol, les hydroquinones, le B-carotène, les flavonoïdes et la proline [55].

Les acides aminés libres, comme la proline, l'histidine et la cystéine, s'accumulent lors d'un stress métallique et pourraient être eux aussi impliqués dans la chélation de divers métaux lourds, notamment du zinc et du nickel [51].

La Proline est un acide aminé protéinogénique essentielle dans les métabolismes primaire [64]. Elle peut fonctionner comme un capteur osmolyte radicale, stabilisateur de macromolécules et un composant de paroi cellulaire [65].

La proline est l'un des solutés compatibles le plus fréquemment accumulé en réponse à des contraintes environnementales variées et joue un rôle important dans la tolérance des plantes et chez les champignons et d'autres microorganismes . La proline a été proposée comme stabilisateur de protéines et de complexes macromoléculaires, piègeur de radicaux libres et régulateur du potentiel redox cellulaire. La concentration intracellulaire de la proline dépend d'une régulation fine entre sa biosynthèse et sa dégradation. Cependant le rôle exact de la proline et les voies de signalisation impliquées dans la régulation de son métabolisme ne sont pas encore complètement élucidés[66] .

## *Chapitre II : matériel et méthodes*



## I. Objectifs

Notre sujet entre dans le cadre de l'étude de l'impact du plomb ou du cadmium sur la croissance et l'activité enzymatique d'une souche fongique appartenant à *Aspergillus sp.*

Ce travail, effectué au sein du laboratoire de Biologie et environnement de l'université Constantine 1, nous permettra par l'intermédiaire des tests de toxicité du plomb ou du cadmium à différentes concentrations de déterminer le degré de résistance de la souche étudiée vis-à-vis de ces éléments.

De plus les dosages de l'activité de la Catalase et de la production de la proline de cette souche fongique permettront de mettre en évidence la réponse biochimique au stress métallique.

## II. Description de la souche testée

La souche fongique utilisée pour cette étude a été isolée dans le laboratoire de Biologie et environnement de l'université Constantine 1. C'est une souche isolée de la rhizosphère de *Lygeum spartum* (plante steppique poussant sur des déblais de mine d'antimoine) et identifiée comme appartenant au genre *Aspergillus sp* [5]. Les caractéristiques de cette souche fongique sont données en annexe.

La souche *Aspergillus sp* est conservée en suspension sporale à différents dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) à 4°C.

## III. Impact du plomb ou du cadmium

### III. 1. Sur la croissance fongique

Deux expériences ont été réalisées pour cette étude:

#### ➤ Tests in vitro gélose Czapek-Dox

cette expérience consiste en une culture sur gélose Czapek-Dox supplémentée en métal à différentes concentrations en Pb (soit 0mM, 2,5mM, 5mM, 7,5mM, 10mM, 15mM) ou en Cd (0mM, 0,0025mM, 0,005mM, 0,0075mM, 0,010mM, 0,015mM, 0,020mM, 0,025mM) la composition et la préparation de ces milieux donnée en annexe.

Dans chaque boîte de Pétri contenant 15 ml de gélose Czapek-Dox supplémentée en métal (Pb) ou (Cd) à une concentration donnée, un disque a été réalisé au centre de la boîte. Puis à l'aide d'une micropipette 0,33μL d'un inoculum de la dilution  $10^{-2}$  de la souche testée a étéensemencé.

Après incubation à 28°C pendant 96 heures, la croissance fongique est estimée par la mesure des diamètres des colonies obtenues.

La concentration minimale inhibitrice de métal (Pb) et (Cd) pour une souche fongique donnée est celle qui inhibera totalement la croissance (D=0cm).

**Remarque :** Ces cultures sont utilisées pour l'observation morphologique des souches et pour le test présomptif de la catalase.

➤ **Tests in vitro sur bouillon Czapek-Dox**

Cette expérience consiste en une culture sur bouillon Czapek-Dox supplémenté en métal à différentes concentrations en Pb (soit 0mM, 2,5mM, 5mM, 7,5mM 10mM, 15mM) ou en Cd (0mM, 0,0025mM, 0,005mM, 0,0075mM, 0,010mM,0.015Mm). (voir annexe )

Dans chaque erlen contenant 50 ml du bouillon Czapek-Dox supplémenté en métal (Pb) ou (Cd) à une concentration donnée , à l'aide d'une micropipette 138  $\mu$ L d'un inoculum de la dilution  $10^{-1}$  de la souche testée a étéensemencé .

Après incubation avec agitation (C24 INCUBATOR SHAKER) à 28°C à rotation 185 RPM pendant 8 jours, la croissance fongique est estimée par le poids des biomasses séchées.

**Remarque :** Ces cultures sont utilisées pour le dosage de l'activité enzymatique et en proline.

### **III. 2. Sur les caractéristiques culturales et morphologiques**

Les caractères culturaux sont suivi par l'observation macroscopique de la souche *Aspergillus sp.*

La morphologie de la souche fongique *Aspergillus sp* est suivi par l'observation microscopique (sous microscope optique LEICA DM750).des fragments mycéliens prélevés sur les colonies qui se sont développées sur gélose Czapek-Dox supplémenté en Pb et Cd.

### **III. 3. Sur l'activité de la Catalase**

L'activité de la catalase est effectuée en réalisant deux tests sur la souche fongique :un test présomptif et un test confirmatif.

➤ **Test présomptif :**

Une goutte d'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) est déposée sur le mycélium obtenu après culture sur gélose.

Le résultat est observé immédiatement en remarquant l'apparition des bulles gazeux (test positif).

➤ **Test confirmatif**

La méthode utilisée est celle de CHANCE et MACHLY (1967)[77].(Voir Annexe ).

L'activité de la catalase est déterminée par spectrophotométrie (spectrophotomètre Jenway 6315) en mesurant l'absorbance à 240 nm lors de la décomposition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par l'enzyme.

Une unité de la catalase décompose 1ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 1 min à 25C.[62]

#### **III. 4. Sur la teneur en proline :**

La méthode utilisée est celle de TROLL et LUIDSLEY(1955) [42]. (Voir Annexe).

La teneur en proline est déterminée par spectrophotométrie (spectrophotomètre Jenway 6315) en mesurant l'absorbance à 528 nm .

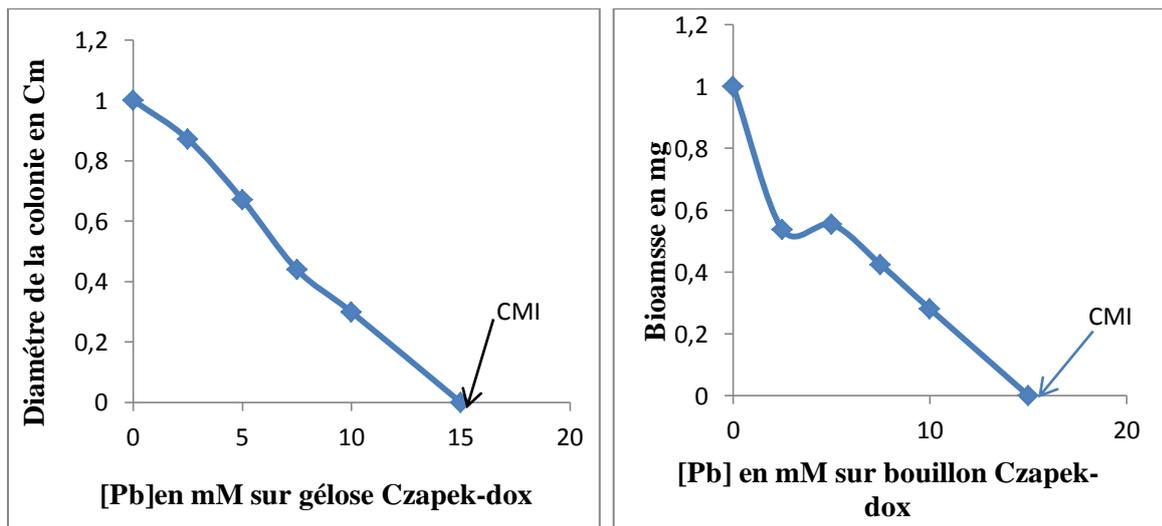
La teneur en proline en est exprimée en  $\mu\text{Mol/mg}$  de M.S.

### *Chapitre III : résultats et discussion.*





**Figure 3: Impact de Pb sur la croissance fongique d'*Aspergillus sp* sur gélose Czapek-Dox supplémentée en Pb à différentes concentrations**



**Figure 4: Courbes normalisées de l'impact du Pb sur la croissance fongique d'*Aspergillus sp* après 96h sur milieu Czapek-dox supplémenté en Pb à différentes concentrations**

## **I. Impact du plomb**

### **I.1. Sur la croissance fongique**

#### **I.1.1. Sur gélose Czapek-Dox**

Les résultats mentionnés dans les figures 3 et 4 permettent de constater une diminution progressive de la croissance fongique *d'Aspergillus sp* avec l'augmentation de la concentration de plomb dans le milieu de culture jusqu'à atteindre une CMI de 15mM (3108 mg/L).

Nos résultats sont en concordance avec plusieurs travaux qui ont montré que dans les milieux de culture supplémentés en plomb à différentes concentrations, la croissance des champignons a diminué progressivement avec l'augmentation de la concentration métallique [1] [27] [31].

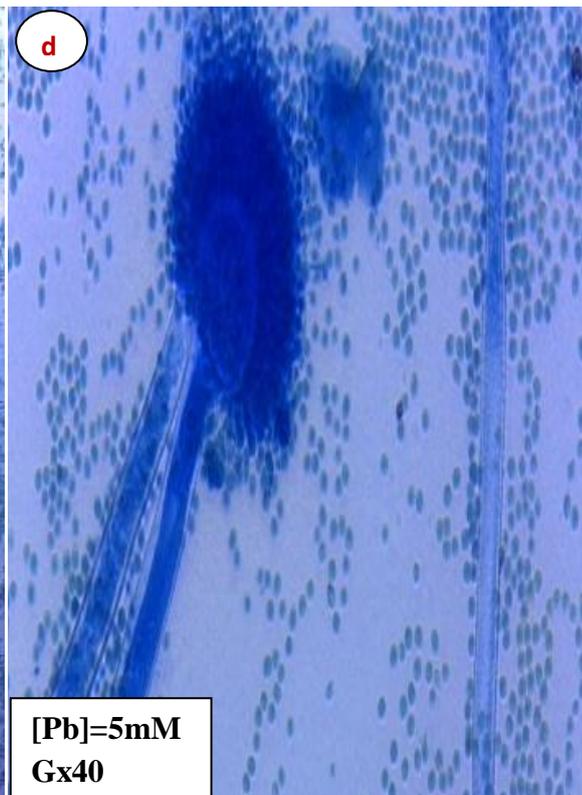
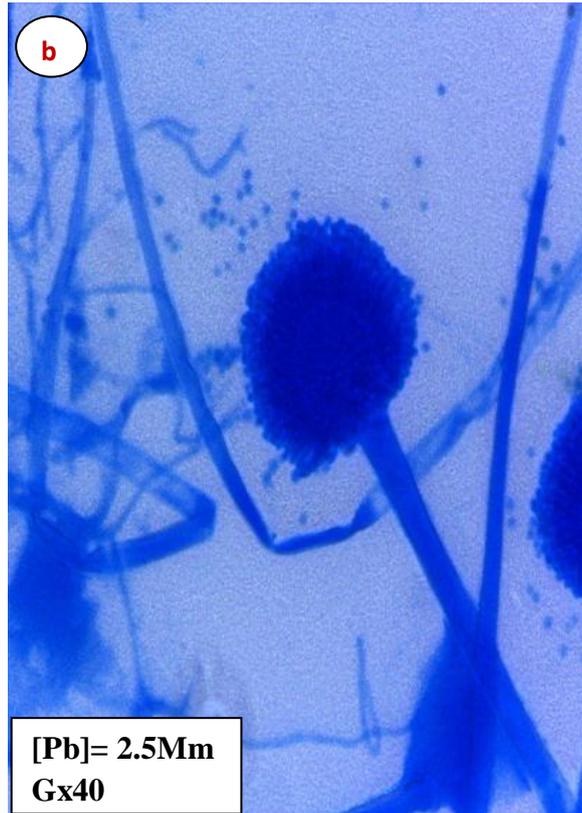
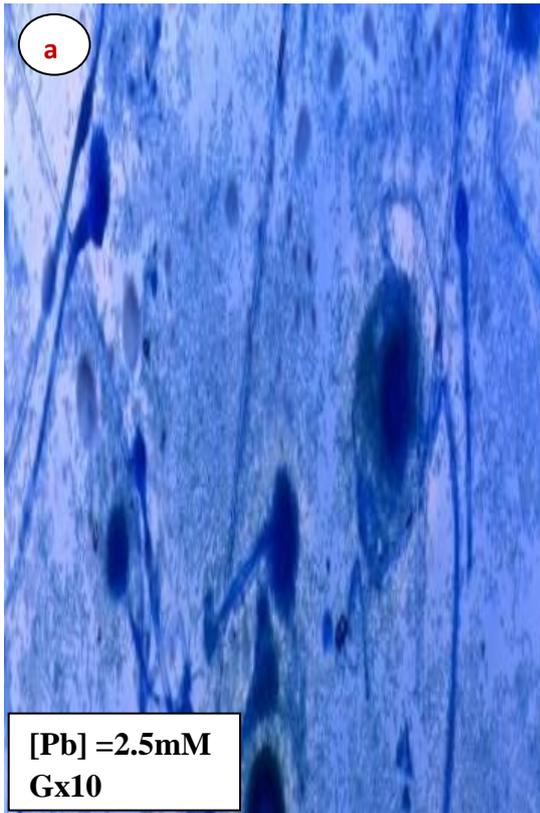
EZZOUHRI et al (2009) ont constaté que les concentrations minimales inhibitrices (CMI) d'*Aspergillus niger* et de *Penicillium* résistants au Pb sont différentes. De fortes variations entre ces champignons testés ont été enregistrées. Elles sont dépendantes de la souche fongique, de l'élément métallique et de sa concentration. La CMI d'*Aspergillus niger* est de 20 - 25 mM pour Pb et celle de *Penicillium sp* est de 12.5 -15 pour Pb [31].

Par contre, d'autres auteurs ont trouvé, pour le plomb, des CMI beaucoup plus faibles : Les CMI d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Penicillium chrysogenum* sont respectivement de 200mg /L, 600mg/L, 100mg/L et 200mg/L [27].

#### **I.1.2. Sur bouillon Czapek-Dox en culture agitée**

La figure 4 permet de constater une diminution progressive de la biomasse fongique avec l'augmentation des concentrations de plomb dans le milieu de culture jusqu'à atteindre une CMI de 15mM (3108 mg/L).

L'étude d'ACHARD-JORIS (2005) a montré que la concentration de 0,8mM en Zn a inhibé la croissance des microorganismes testés (bactéries et champignons) quelque soit le milieu de culture utilisé (milieu gélifié ou liquide) [67].



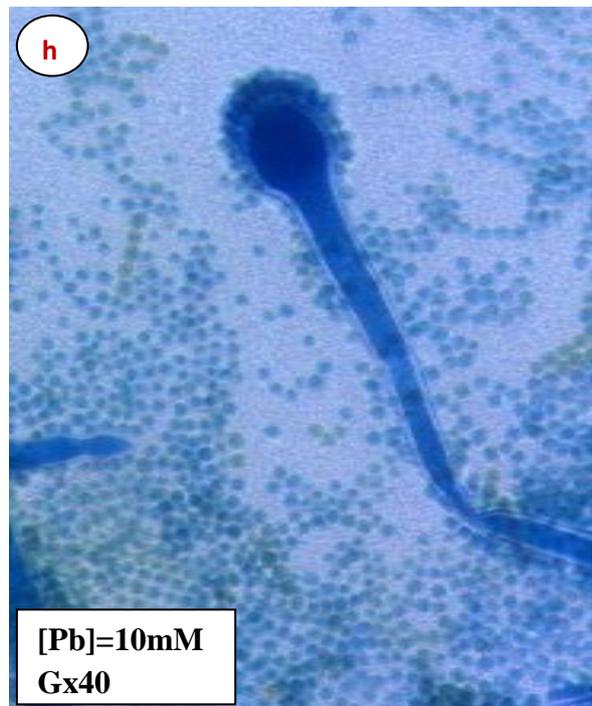
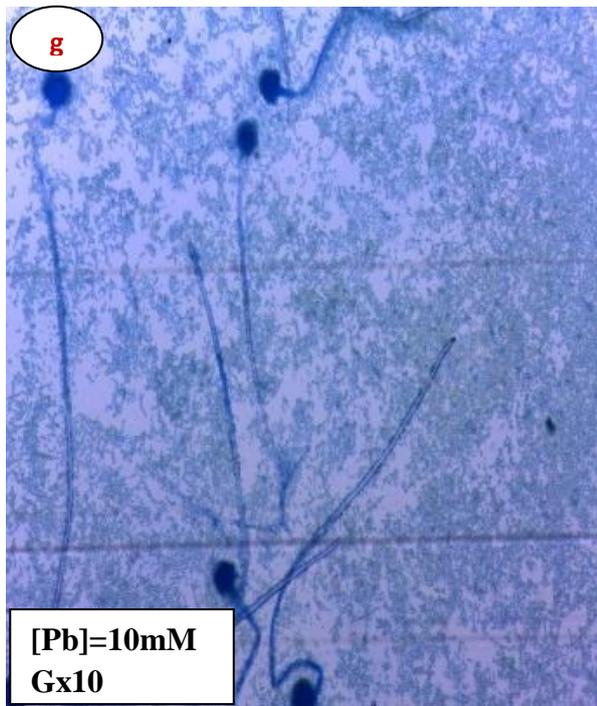
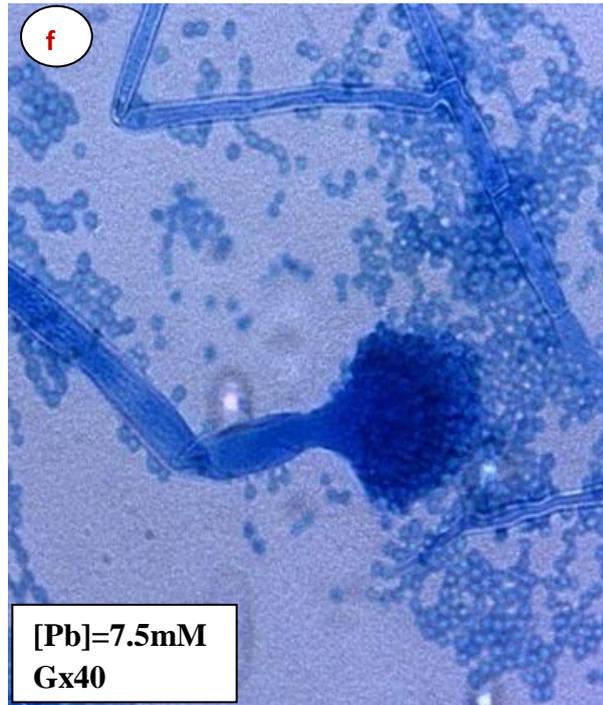
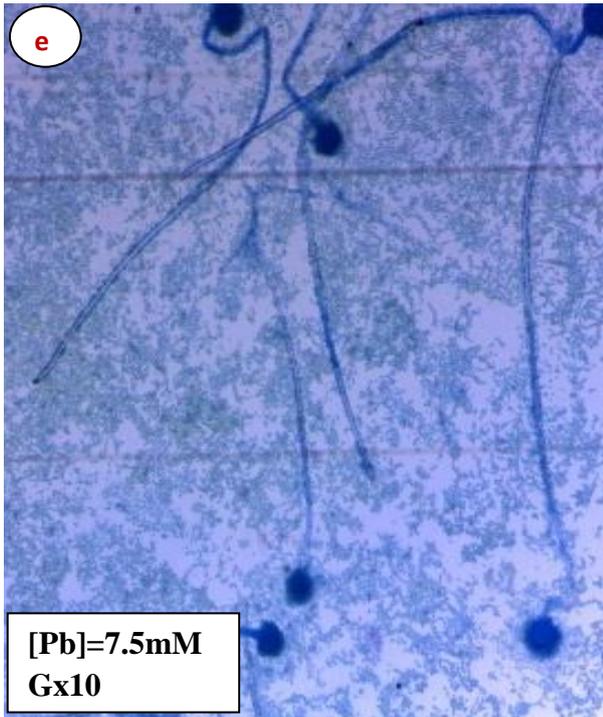


Figure 5 : Etude microscopique comparative de la souche *Aspergillus sp* à différentes concentrations en Pb (grossissement  $\times 10$  et  $\times 40$ )

## I.2. Sur les caractères cultureux et morphologiques de la souche fongique

L'observation macroscopique de la souche *Aspergillus sp* permet de constater qu'aucune modification dans les caractères cultureux de la souche (aspect poudreux, couleur jaune) n'a été constatée. (Voir figure 3)

L'observation microscopique de la souche permet de constater une modification morphologique de la souche avec l'augmentation de la concentration en plomb dans le milieu de culture. Des changements de l'aspect du mycélium, des déformations des conidiophores et une diminution du nombre des spores ont été observés. (Voir figure 5)

A 0 mM en Pb, le mycélium observé est septé, clair et large, les conidiophores sont lisses sans ramification, les têtes conidiennes sont radiées et bisériées à vésicules globuleuses, et conidies globuleuses, le nombre des spores est important. (Figure 16 en annexe)

A 2,5 mM en Pb, le mycélium est un peu fin, les têtes conidiennes sont nombreuses et plus petites. (Figure 5a et b)

A 5 mM, le mycélium est un peu plus fin, les têtes conidiennes sont moins nombreuses avec de petites vésicules sphériques. Le nombre de spores diminué. (Figure 7c et d)

A 7,5 mM en Pb, le mycélium est émacié, les têtes conidiennes sont moins nombreuses par rapport à 5 mM avec de très petites vésicules cylindriques. Le nombre des spores est plus faible. (Figure 5 e et f)

A 10 Mm en Pb, le mycélium devient plus fin, moins dense et court. Les têtes conidiennes en forme d'épingle de cheveux sont en faible nombre. (Figure 5 h et g)

L'étude d'ELKHAWAGA (2011) a montré que 200 mg/L de Pb dans le milieu provoquent des déformations de hyphes d'*Aspergillus nidulans*. Cette déformation s'accroît avec l'augmentation de la concentration métallique [1].

Le plomb, métal moins toxique que les autres métaux testés (Cd et Zn), a causé des variations dans les caractères cultureux et morphologiques de *Penicillium sp* [71].

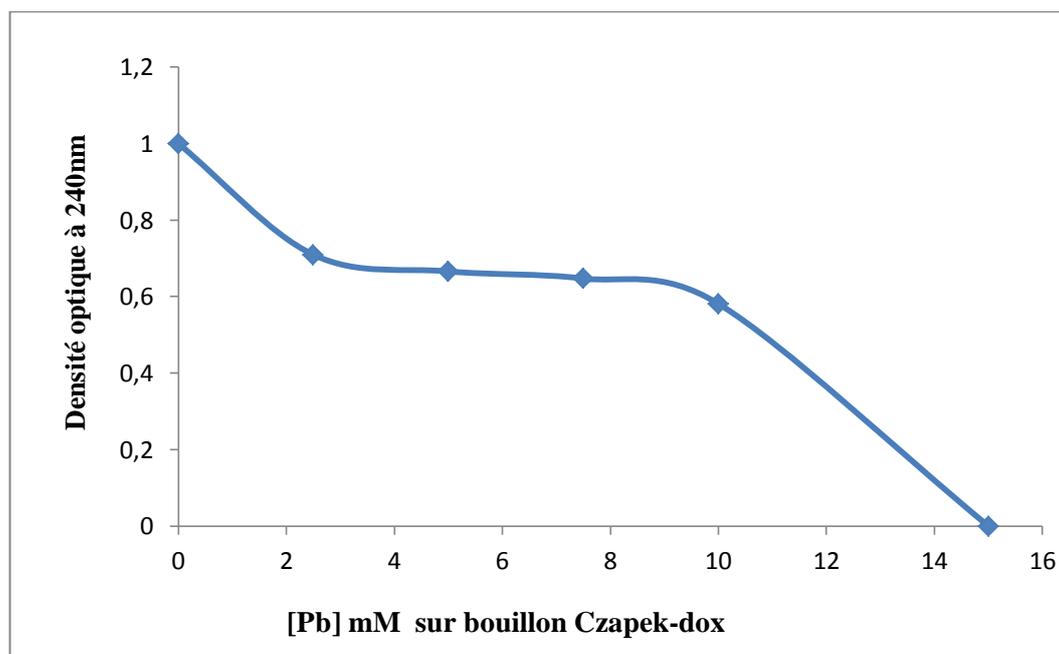
L'observation au microscope optique de souches fongiques cultivées dans des milieux de culture supplémentés en antimoine à différentes concentrations, a révélé sur le plan morphologique des modifications plus ou moins importantes selon la concentration de l'antimoine: A 500 mg/L de Sb, des changements de l'aspect du mycélium et une réduction des spores ont été notés [42].

Après observation sous microscope électronique, des déformations dans les conidiophores mycéliens d'*Aspergillus niger* ont été mises en évidence lorsque la concentration d'arsenic dans le milieu est élevée [74].

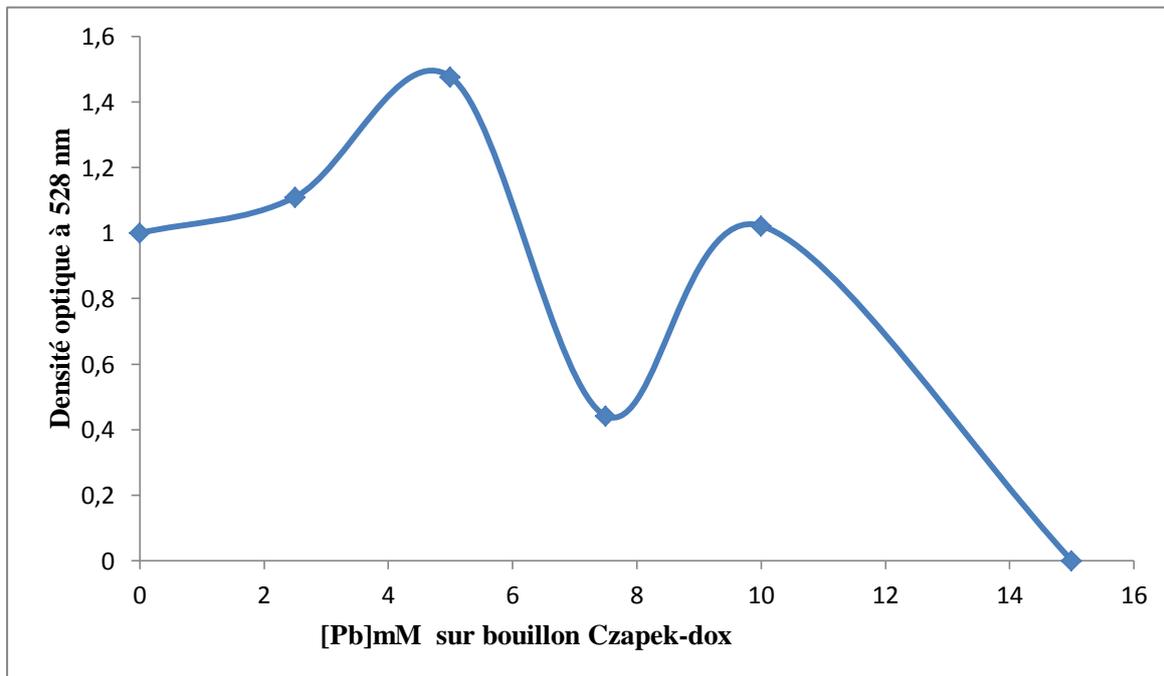
La répartition des ions de mercure à la surface du mycélium d'*Aspergillus versicolor* a provoqué des changements morphologiques dans les structures de mycélium [72].



**Figure 6: Test présomptif de l'impact du Pb sur l'activité catalasique d'*Aspergillus sp* sur gélose Czapek-dox**



**Figure 7: Courbe normalisée de l'impact du plomb sur l'activité catalasique d'*Aspergillus sp.***



**Figure 8 : Courbe normalisée de l'impact du plomb sur la teneur en proline d'*Aspergillus sp.***

### I.3. Sur l'activité de la catalase

Le Test présomptif permet de mettre en évidence un dégagement des bulles gazeuses ce qui indique une production de catalase dans le milieu de culture (Voir figure 6).

La figure 7 montre une diminution progressive de l'activité de la catalase avec l'augmentation de la concentration de plomb dans le milieu de culture.

L'étude de LIU et al (2007) a montré qu'il existe une corrélation négative entre l'activité enzymatique du sol et la teneur en plomb et en cadmium du sol irrigué par des eaux usées. L'activité de la catalase du sol diminue avec l'augmentation des concentrations métalliques, par conséquent, la catalase peut être considérée comme l'indice biochimique qui reflète le degré de pollution par le Pb et le Cd [60].

L'activité de la catalase pour toutes les souches testées (*Fusarium sp*, *Aspergillus sp*, *Glomus sp*, *Rhizopus sp*) a diminué progressivement avec l'augmentation de l'antimoine dans le milieu [42].

Pour le Cr, l'activité de la catalase dans les sols a diminué avec l'augmentation de Cr. A 20 mg/kg en Cr, l'activité de la catalase a été inhibée [74].

L'activité catalasique chez *Aspergillus niger* a augmenté initialement lors d'un traitement par l'arsenic à des concentrations allant jusqu'à 50 mg/L .Puis au-delà de cette concentration, une diminution de cette activité a été notée. Elle est très faible à 100 mg/L [75].

#### **I.4.Sur la teneur en proline**

La figure 8 montre une augmentation progressive de la teneur en proline dans le milieu avec l'augmentation du plomb dans le milieu jusqu'à atteindre son maximum à la concentration 5 mM puis elle subit une diminution brutale à la concentration 7,5mM puis augmente légèrement à 10mM.

L'étude de MUKHERJEE et al (2010) a montré que la teneur en proline a augmenté de 182%, 253% et 290% à 25, 50 et 75 mg / L d'arséniate respectivement, puis la teneur en proline a diminué à 100mg/l de l'arséniate, L'augmentation de la teneur en proline par accumulation peut être une partie du mécanisme de protection de la souche *Aspergillus niger*. La diminution est due peut être à la perturbation dans le mécanisme de détoxification cellulaire soit la dégradation de la proline ou sa disparition du milieu [75].

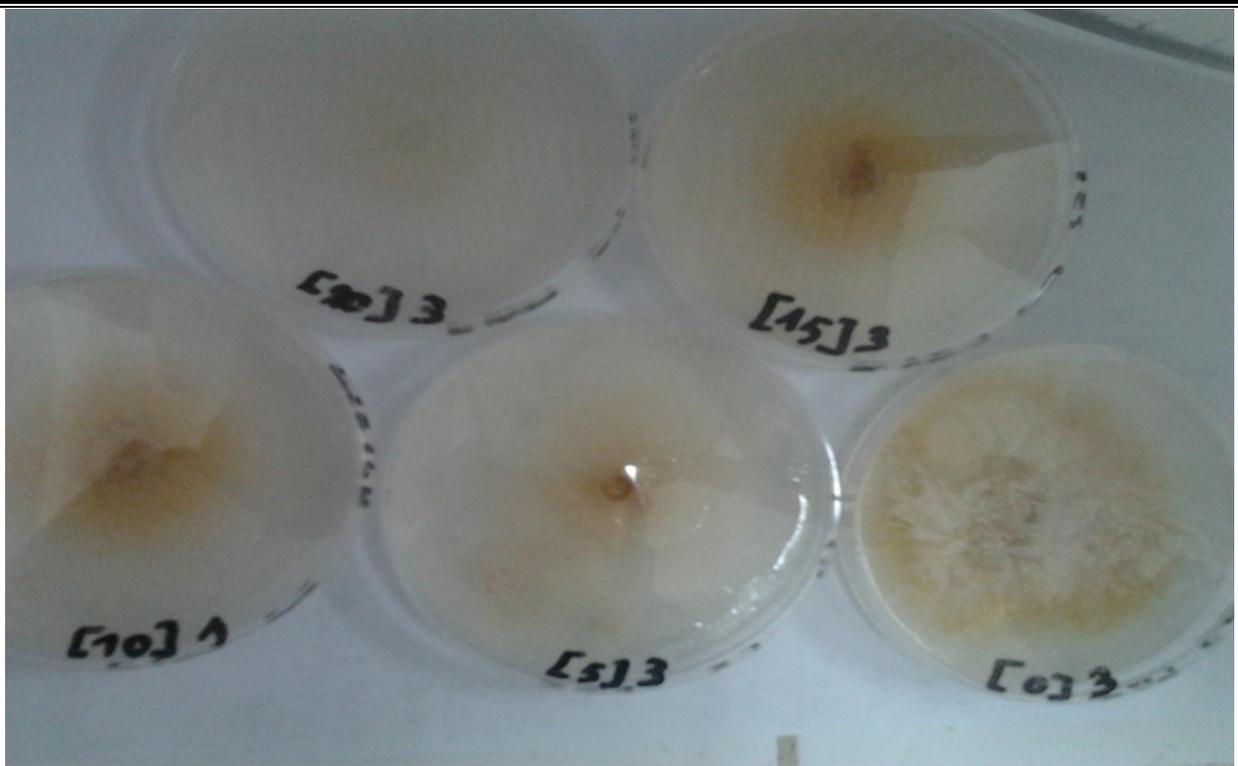


Figure 9: Impact de Cd sur la croissance fongique d'*Aspergillus sp* sur gélose Czapek-Dox supplémentée en Cd à différentes concentrations.

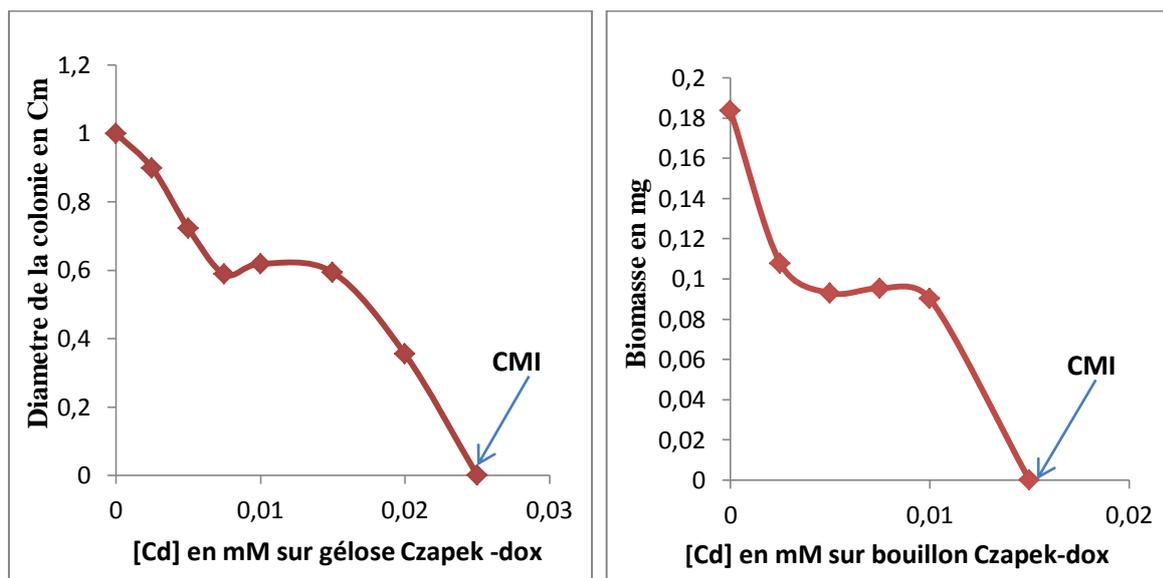


Figure 10: Courbes normalisées de l'impact de Cd sur la croissance fongique d'*Aspergillus sp* après 96h sur milieu supplémenté en Cd à différentes concentrations.

## **II Impact du Cadmium**

### **II.1. Sur la croissance fongique**

#### **II.1.1. Sur gélose Czapek-Dox**

Les résultats mentionnés dans les figures 9 et 10 permettent de constater une diminution de la croissance fongique d'*Aspergillus sp* respectivement avec l'augmentation de la concentration en cadmium dans le milieu de culture jusqu'à atteindre une CMI égale à 0,025 mM (5,48 mg/L).

Nos résultats sont en concordance avec plusieurs travaux qui ont montré que dans le milieu de culture supplémenté en cadmium à différentes concentrations, la croissance des champignons (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fichiri*, d'*Aspergillus nidulans*, *Penicillium sp* et *Saccharomyces cerevisiae*) a diminué progressivement avec l'augmentation de la concentration métallique [24] [30] [68] [69].

La CMI d'*Aspergillus nidulans* est de 0,025 mM après traitement par le cadmium à différentes concentrations. Ceci souligne la haute toxicité de cadmium pour la croissance de ce champignon [69].

Par contre l'étude de MALAYERI (1995) a montré pour *Penicillium sp* une CMI de l'ordre de 50 mg/L soit une concentration très élevée en cadmium [25].

#### **II.1.2. Sur bouillon Czapek-Dox en culture agitée**

Les résultats mentionnés dans la figure 10 permettent de constater une diminution de la biomasse fongique progressivement avec l'augmentation des concentrations de cadmium dans le milieu de culture jusqu'à atteindre une CMI de 0.015mM (1,6816 mg/L).

L'étude de MALAYERI (1995) a montré que les doses élevées des métaux lourds (Cd, Ni, Cr, Cu, Zn) ont affecté la population, la croissance et diminuent le taux de la biomasse produite chez *Penicillium sp*. La sensibilité de ce champignon aux excès de métaux lourds dépend de la nature de l'élément et du type de milieu [25].

## II.2. Sur les caractères cultureux et morphologiques de la souche fongique

Pour les concentrations 0,0025mM, 0,005mM et 0,0075mM en Cd, l'observation macroscopique de la souche *Aspergillus sp* permet de constater qu'aucune modification dans les caractères cultureux de la souche (aspect poudreux, couleur jaune) n'a été constatée.

A partir de la concentration 0,010 mM, des modifications dans les caractères cultureux de la souche ont été observées. (aspect, couleur) : l'aspect de la colonie devient visqueux et la couleur jaune de la souche s'éclaircit de plus en plus.

A 0,020mM, la colonie est transparente. (Figure 17 en annexe).

L'étude de SARITA et TABITHA a montré que le cadmium est plus toxique que les autres métaux testés (Pb et Zn). Il a causé des variations dans les caractères cultureux et morphologiques de *Penicillium sp* [71].

L'observation au microscope optique a présenté une perturbation dans la morphologie d'*Aspergillus sp*. En effet avec l'augmentation de la concentration de cadmium dans le milieu de culture, la présence de cadmium a causé des malformations du mycélium et des conidiophores. Une réduction du nombre des spores a été observée (Voir figure 11).

A 0,0025 mM en Cd, le mycélium est un peu fin, les têtes conidiennes sont nombreuses et plus petite. (Figure 11a et b)

A 0,005 mM en Cd, le mycélium est plus fin, les têtes conidiennes non radiés et moins nombreuses avec des petites vésicules sphériques. Le nombre de spores est moins nombreux. (Figure 11c et d).

A 0,0075 mM en Cd, le mycélium est plus fin moins dense et court. Les têtes conidiennes sont beaucoup moins nombreuses avec des vésicules ovales très petites. Le nombre des spores est plus faible. (Figure 11 e et f).

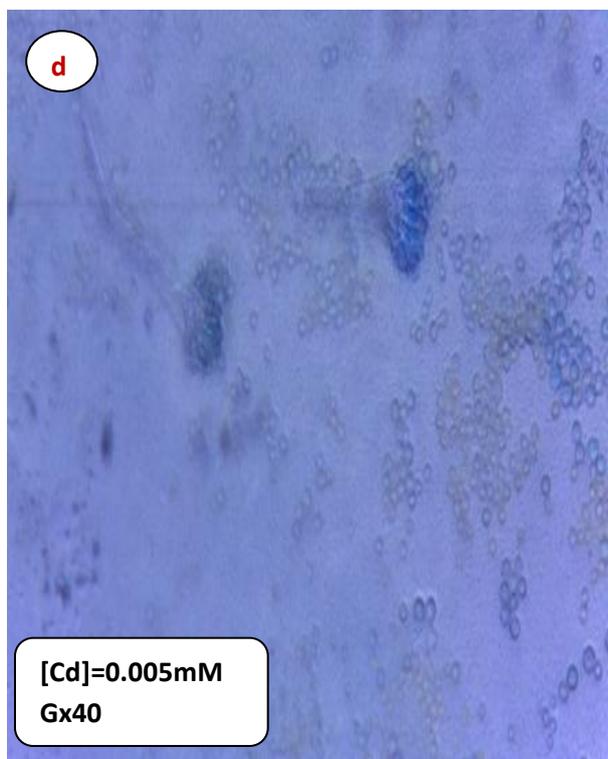
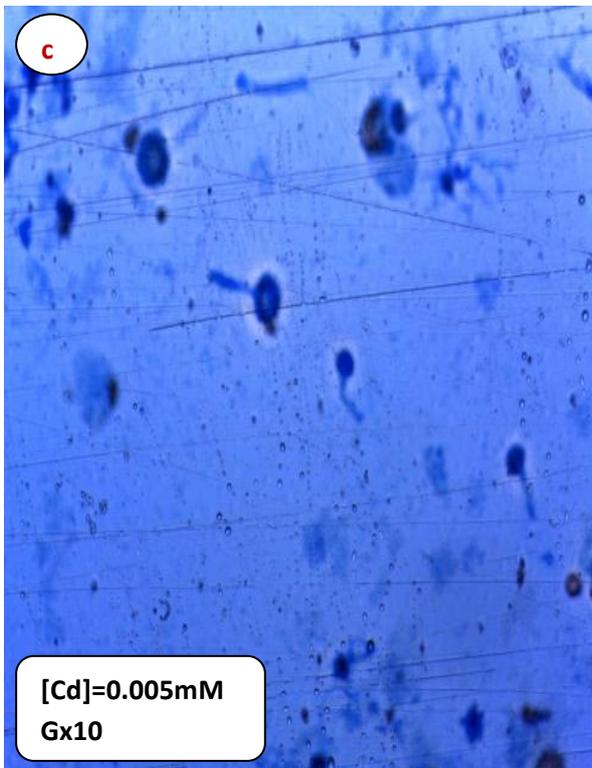
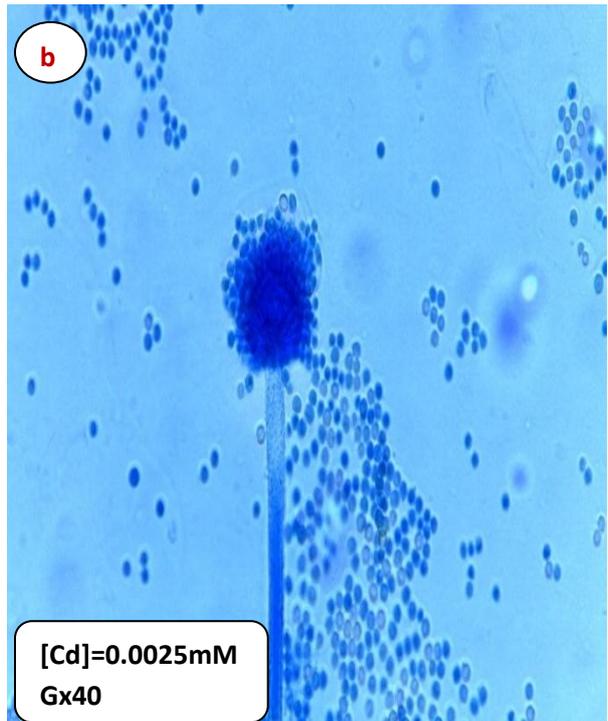
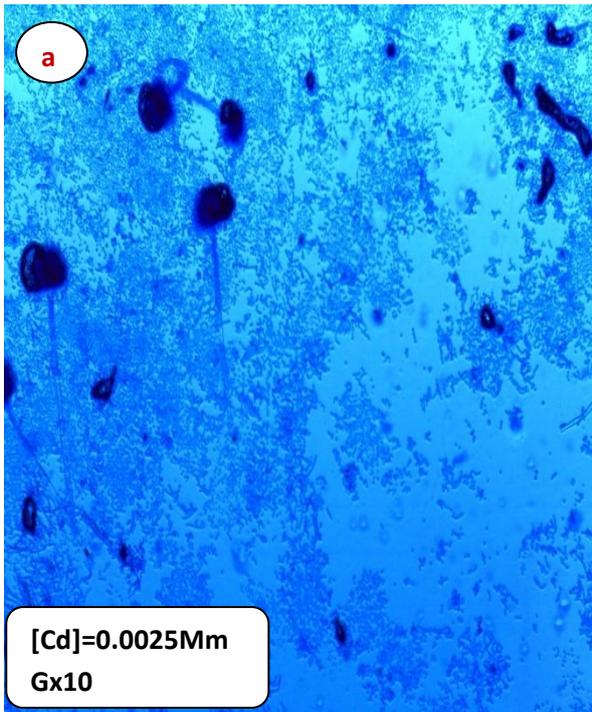
A 0,020 mM en Cd, le changement structurel est plus important : le mycélium s'est émacié de plus en plus, il devient plus fin, dense et court. Les têtes conidiennes sont en faible nombre avec de très petites vésicules cylindriques (Figure 11g et h).

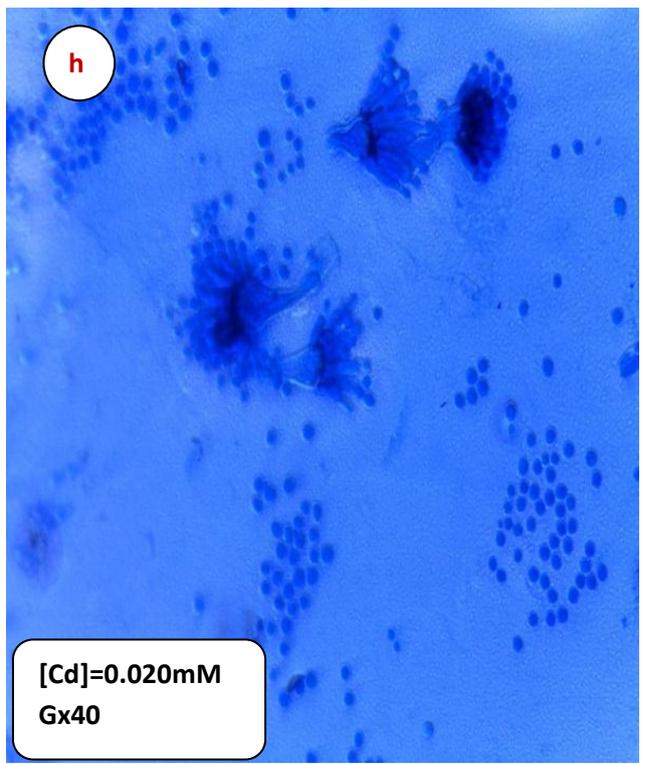
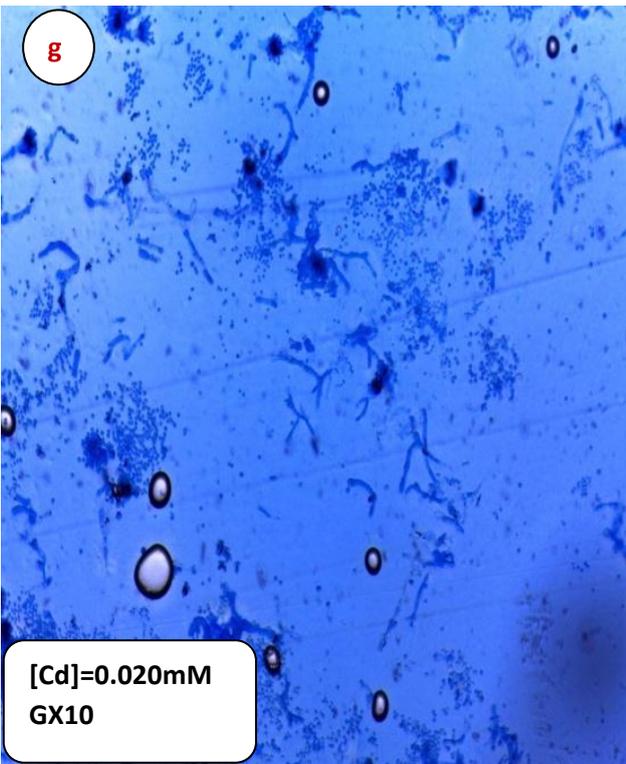
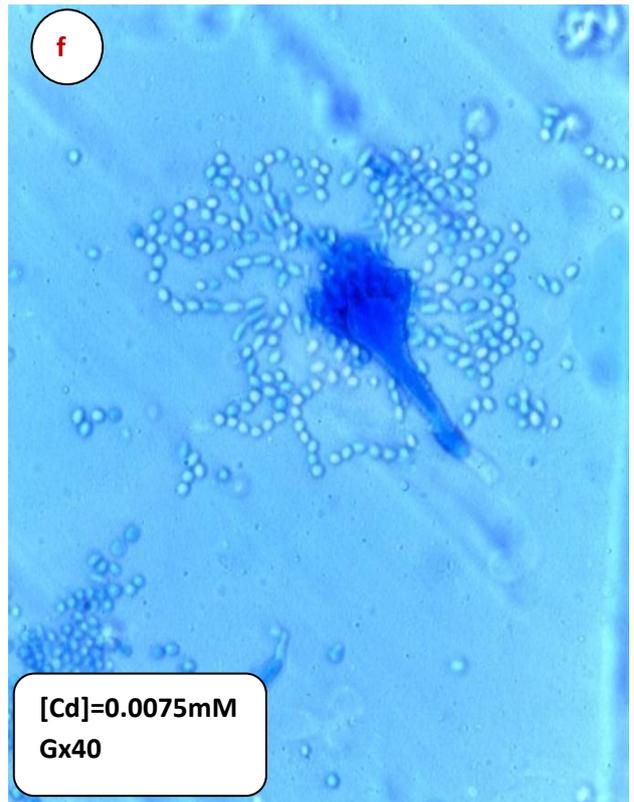
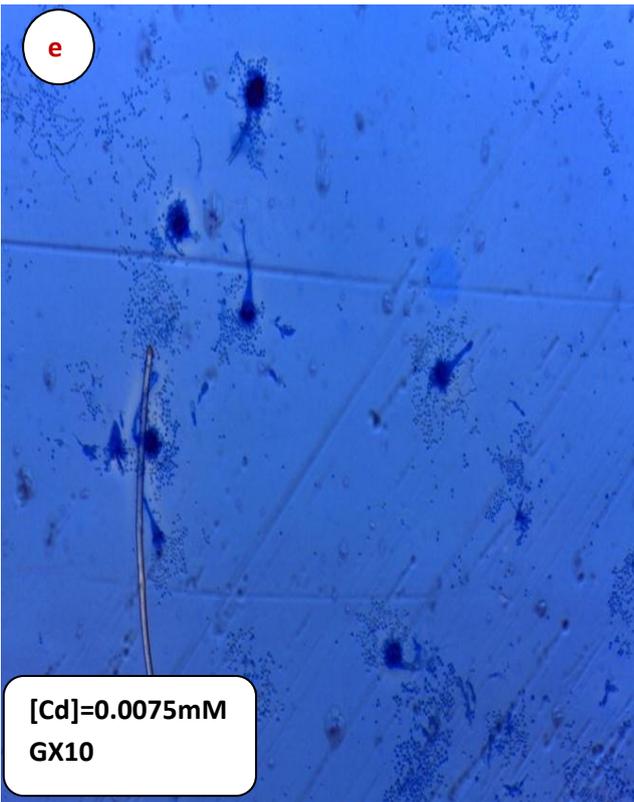
L'observation au microscope optique a montré une accumulation de Cd au sein du mycélium d'*Aspergillus nidulans* directement corrélée avec l'augmentation de la concentration de Cd [69].

L'étude de SUJOY *et al* (2007) a montré que le zinc modifie la morphologie des champignons et provoque une réduction significative de la germination des conidies à haute

concentration de Zn, Cette modification est dépendante de la concentration en Zn et de la souche fongique [73].

La répartition uniforme des ions de  $Zn^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni$ , à la surface du mycélium d' *Aspergillus versicolor* provoque des changements morphologiques dans les structures de mycélium (des élongations du mycélium et des déformations des conidies ont été observées ) [1].





### II.3. Sur l'activité de la catalase

Le Test présomptif permet de remarquer une effervescence et un dégagement des bulles gazeuses indiquant la production de catalase dans le milieu (Voir figure 12).

La figure 13 présente l'impact de Cd sur l'activité de la catalase d'*Aspergillus sp*. Cette activité est stimulée avec l'augmentation de la concentration en Cd allant à un maximum à la concentration 0,005mM. Cependant, au-delà de ce seuil, l'activité de la catalase a diminué pour atteindre le minimum à la concentration de 0,01mM de Cd.

L'étude de CHAKRABORTY et al (2014) a montré que l'activité catalasique de la souche *Aspergillus niger* a augmenté initialement au stress Cd et a atteint un maximum à une concentration de 5 mM de Cd où l'augmentation était 2,37 fois par rapport au témoin. Cette augmentation de l'activité CAT suggère que le traitement Cd induit une réponse antioxydante à l'intérieur de la souche. Cependant, l'activité de la CAT a diminué avec une nouvelle augmentation de la contrainte Cd pour atteindre le minimum à la concentration de 20 mM Cd où une diminution de 1,5 fois a été observée en comparaison avec le témoin [76].

Une augmentation de l'activité de la CAT dans *A. Niger* en présence d'arséniate a été constatée. L'augmentation de l'activité de la CAT à 25 et 50 mg /L de traitement par l'arséniate indique qu'il ya un effort de la part du champignon de neutraliser ou de réduire l'effet dangereux de ROS générés par l'arséniate [62].

### II.4. Sur la teneur en proline

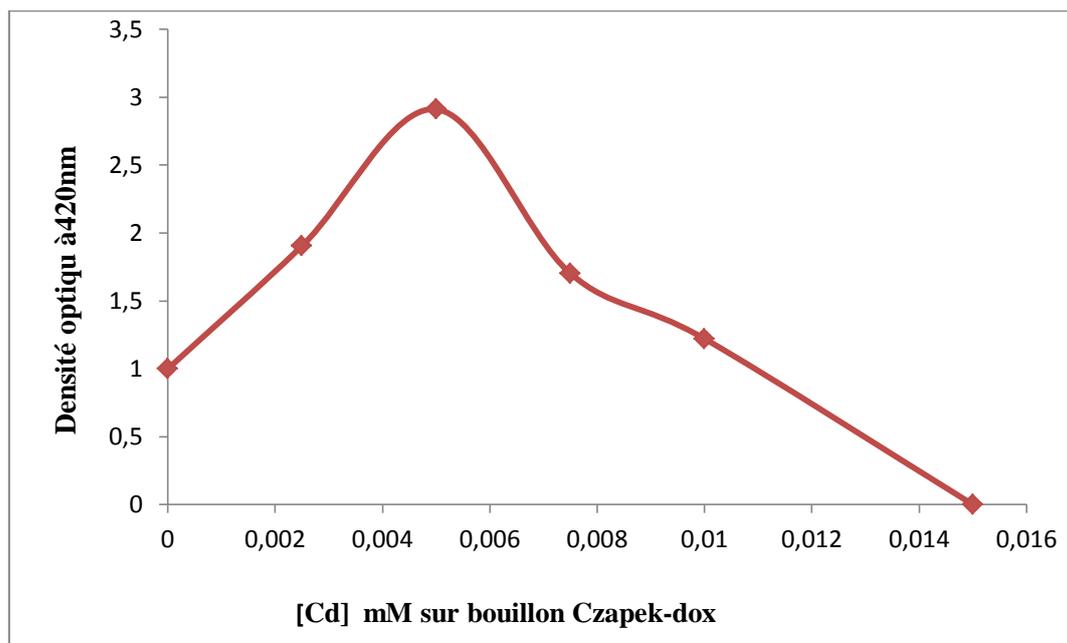
La figure 14 montre que la production de proline a augmenté avec une l'accroissement de la concentration de Cd dans le milieu jusqu'à atteindre son maximum à la concentration 0,0025mM. Ensuite elle commence à diminuer progressivement à la concentration 0,005mM et 0,0075mM.

A 0.010mM de Cd, la souche *Aspergillus sp* a récupéré sa capacité de production de proline qui atteint une valeur importante proche du maximum. Ensuite elle décline rapidement.

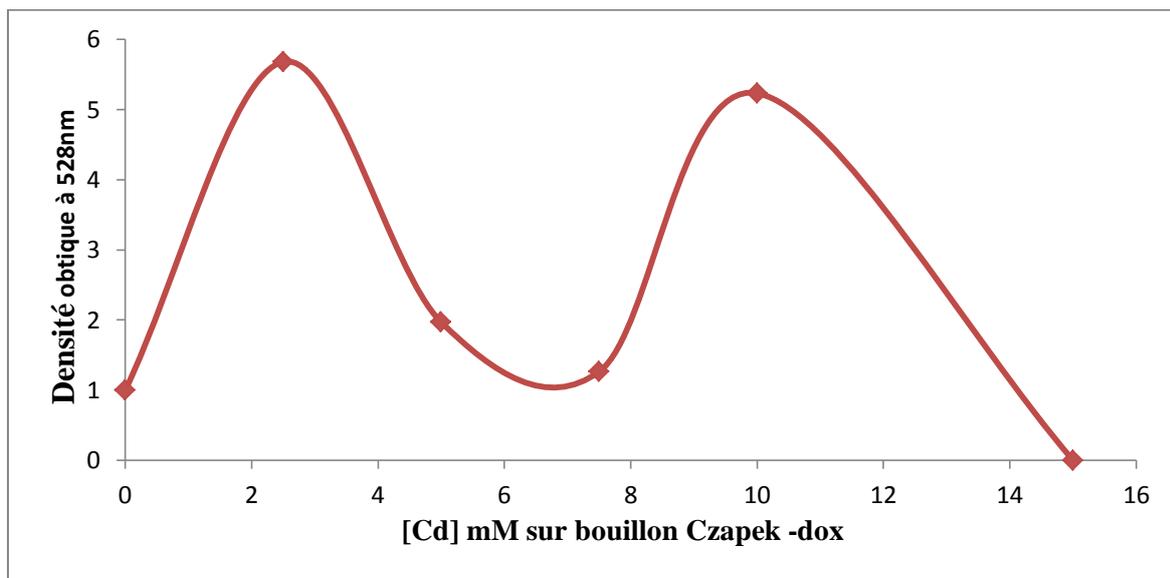
L'étude de CHAKRABORTY et al (2014) a montré une augmentation initiale de la teneur en proline de la souche *Aspergillus niger* exposée à de faibles concentrations en Cd 10,15et 20mM. La synthèse de la proline est impliquée dans les mécanismes de chélation ou de détoxification du cadmium. Toutefois, la diminution de la teneur en proline à des concentrations plus élevées supérieure à 25mM Cd peut indiquer l'intolérance de la souche à ces concentrations [76].



**Figure13 : Test présomptif de l'impact du Cd sur l'activité catalasique d'*Aspergillus sp* sur gélose Czapek –dox.**



**Figure 14: Courbe normalisée de l'impact du Cadmium sur l'activité catalasique d'*Aspergillus sp*.**



**Figure 15: Courbe normalisée de l'impact du cadmium sur la teneur en proline d'*Aspergillus sp.***

# *Conclusion*

Les expérimentations réalisées au cours de notre étude portent sur :

- L'impact du plomb ou du cadmium sur la croissance et la morphologie de la souche *Aspergillus sp.*
- L'impact du plomb ou du cadmium sur l'activité catalasique et sur la production de la proline de cette souche.

Nos résultats permettent de révéler les points suivants :

- La toxicité du Plomb et du cadmium se traduit par une diminution du taux de croissance, une modification des caractères culturaux et morphologiques d'*Aspergillus sp.*
- Le cadmium possède un degré de toxicité plus élevé que celui du plomb et ceci quelque soit l'état du milieu de culture utilisé (solide ou liquide).
- Le plomb ou cadmium peuvent perturber ou /et inhiber les voies métaboliques de la souche. A de faibles concentrations en Pb ou Cd dans le milieu une réponse antioxydante est induite à l'intérieur de la souche *Aspergillus sp.* Au delà d'un seuil critique, la réaction au stress métallique devient faible et met en évidence l'adaptation limitée de cette souche à ces métaux.

En perspective, il serait intéressant de connaître l'impact d'autres métaux lourds sur cette souche afin de déterminer son aptitude éventuelle à désinfecter les sols pollués par ces mêmes métaux.

*Références*  
*Bibliographiques*

[1]-**ELKHAWAGA, M.A.** Morphological and Metabolic Response of *Aspergillus nidulans* and *Fusarium oxysporum* to Heavy Metal Stress. *Journal of Applied Sciences Research*. 2011.**7(11)**: 1737-1745.

[2]- **DOILLON, D.** *Déterminants moléculaires de la tolérance au zinc des microorganismes eucaryotes*. Thèse de Doctorat en biologie forestière.2010. Université Henri Poincaré, Nancy1.

[3]-**HUYNH, T D.** *Impacts des métaux lourds sur l'interaction plante/ ver de terre/microflore tellurique*. Thèse de doctorat en écologie microbienne.2009 .Université Paris Est.

[4]-**HABI, S.** *Etude de la métallo-résistance et de l'halo-tolérance des entérobactéries isolées des eaux de surface de la région de Sétif*. Thèse de doctorat d'état en sciences de la nature et de la vie.2009. Université Ferhat Abbas – Sétif.

[5]-**MEGHNOUS ,O ;MEGHRAOUI,A.** *Identification des souches fongique isolées de la rhizosphère d'*Hedysarum pallidum* et *Lygeum spartum* poussant sur des déblais de mine d'antimoine de la région d'Ain-Babouche.Impact de l'antimoine ou du chrome sur la croissance fongique*. Mémoire de Master en biotechnologie des mycètes. 2011.Université Mentouri Constantine.

[6]-**CROSNIER ,J;DELOLME, C.** Influence des micro-organismes sur la mobilité des métaux lourds dans le sol. *Soil Biol.Biochem*.1994.**41** :1-7.

[7]- **VARRAULT,G.** *Les contaminants dans les milieux récepteurs sous forte pression urbaine*. Mémoire de Diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches. 2012.Université Paris Est Creteil Val de Marne .

[8]- **CHAUSSE, K; PHANEUF, D ; LEVALLOIS, P** .*Fiches synthèses sur l'eau potable et la santé humaine : Plomb*. Institut national de santé publique , Québec.2003 .P.1-14.

[9]- **OULHOTE, Y.** *Contribution de l'environnement résidentiel à l'exposition au plomb des enfants de 6 mois à 6 ans en France, 2008-2009.* Thèse de Doctorat en environnement et santé publique 2012. université Lorraine.

[10]-**BABA, A .A.** *Etude de contamination et d'accumulation de quelques métaux lourds dans des céréales, des légumes et des sols agricoles irrigués par des eaux usées de la ville de Hammam Boughrara .*Thèse de doctorat en chimie de l'environnement.2012. Université Abou Bekr Belkaid , Tlemcen.

[11]-**ROYAUME DU MAROC Ministère de l'Aménagement du Territoire, de l'Eau et de l'Environnement.** *Rapport relatif au Plomb et Cadmium .* Secrétariat général direction de la surveillance et de la prévention des risques.2005.1-21.

[12]-**MARTIN-GARIN, A ; SIMON,O.** *Fiche de radionucléide :cadmium 109 et environnement.* Direction de l'environnement et de intervention-service des études du comportement des radionucléides dans l'écosystème .2004.1-14.

[13]- **NZENGUE, Y.** *Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines et de p53.* Thèse de doctorat en Biologie.2008 Université Joseph Fourier ,Grenoble 1.

[14]-**KAYALTO , B .** *Contribution à l'évaluation de la contamination par les métaux lourds, de trois espèces de poissons, des sédiments et des eaux du lac Tchad.* Mémoire d'études approfondies (DEA) en sciences alimentaires/nutrition. 2009. Université de Ngaoundere .

[15] -**BENDADA, K ;BOULAKRADECHE,M .***Optimisation des conditions de dosage par spectroscopie d'absorption atomique (SAAF et SAAET) : Application à la détermination de la pollution et de la bioaccumulation des métaux lourds.* Mémoire de Master en Chimie. 2011.Université des Sciences et de La technologie Houari Boumediene (U.S.T.H.B)

[16]-**PICOT,A.** *L'Antimoine, un vieux toxique toujours méconnu .J. Environmental Monitoring France . 2006.2 :1-12.*

[17]-**BEAUGLIN ,K ; GERNIER,J.** *Fiche radionucléique : Antimoine 125 et environnement.*2002 Université de Genève .[en ligne]. Disponible sur internet :<http://net-science.irsn.org>.(consulté le :20/02/2014).

[18]-**IMPERT ,H.***Risque sanitaire en cour par une population vivant au voisinage d'une unité fonderie de zinc et la présence de thallium et l'antimoine.* Mémoire d'ingénieur en génie sanitaire. 2007. ENSP école nationale de la santé publique. Toulouse.

[19]-**PICOT, A.***les métaux lourds : de grands toxiques.* 2006.[en ligne].Disponible sur <http://atctoxicologie.ifrance.com>. (consulté le : 02-02-2014).

[20]-**BENEDETTO, D.** Méthodes spectrométriques d'analyse et de caractérisation ,dossier SAM 1997: les métaux lourds . [en ligne]. Disponible sur internet :<http://www.Dionex.Com/product.html>.(consulté le :20/02/2014).

[21]- **STEKETEE ,J.** Cahiers SKB : métaux lourds .*Fondation développement et transfert de connaissances sur le sol* .2010.1-74 .

[22]- **MOINET,G.** *Fonctionnement d'un écosystème forestier développé sur un technosol multi contaminé.* Thèse de Doctorat en pharmacie .2012.université de Rouen.

[23]- **BAUDOIN,E;BENIZRI, E; GUCKERT, A.** Metabolic fingerprint of microbial communities from distinct maize rhizosphere compartments. *Eur. J. Soil Biol.*2001. **37**.P.85-93.

[24]- **BELLION,M.** *Caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans la tolérance au stress métallique chez les champignons ectomycorhiziens par agrotransformation d'Hebeloma cylindrosporum* .Thèse de Doctorat en Biologie Végétale et Forestière . 2006. Université Henri Poincaré, Nancy I.

[25]-**MALAYERI ,B.** *Décontamination des sols contenant des métaux lourds à l'aide de plantes et de microorganismes.* Thèse de doctorat en biologie des organismes. 1995. Université Henri Poincaré, Nancy I.

[26]- **JACOB, C.** *Etude des interactions entre métaux lourds et champignons ectomycorhiziens: mise en évidence de gènes impliqués dans la réponse au cadmium de Paxillus involutus.* Thèse de Doctorat en Biologie Forestière .2001.Université Henri Poincaré, Nancy 1.

[27]-**IRAM,S;ZAMAN,A;IQBAL,A;ZSHABIR,R.** Heavy metal tolerance of fungus isolated from soil contaminated with sewage and industrial wastewater. *Pol.J.Environ.Stud.*2012.**22**:691-697.

[28]- **TOBINE,JM ,COOPER,NEUFELD,RJ.** Uptake of metals ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Environ microb.*1984.**47**:821-827.

[29]-**AHMED,I ;ANSARI,M ;AQIL,F** .Biosorption of NI, Cr and Cd by metal tolerant *Aspergillus Niger* and *Penicillium sp.* Using single and multi-metal solution .*India J. Exp. Biol.*2006.**44**:73-76.

[30]- **BABICH ,H ; STOTZKY,G.** Effect of cadmium on fungi and on interactions between fungi and bacteria in soil: influence of clay minerals and pH. *Applied and environmental microbiology.* 1976.**33**: 1059-1066.

[31]-**EZZOUHRI,L ; CASTRO,E ;MOYA,M. ;ESPINOLA,F; LAIRINI,k.** Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. *African Journal of Microbiology Research.*2009. **3 (2)** : 35-48.

[32]- **CERVANTES,C; GARCÍA,J,C ; DEVAR,S ;CORONA ,G; TORRES,G; SÁNCHEZ,R.** Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews.*2001. P.335–347.

[33]-**CHAUSSOD, R.** La qualité biologique des sols : Evaluation et implications. Etude de gestion de sol, *INRA*, 1996.3:261-274.

[34]-**MONCHY, S.** *Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez Cupriavidus metallidurans CH34.* Thèse présentée pour l'obtention du titre de Docteur en Sciences 2007. Université libre de Bruxelles.

[35]-**REDON, P.** *Rôle de champignons mycorhiziens à arbuscules dans le transfert du cadmium (Cd) du sol à la luzerne (Medicago truncatula).* Thèse présentée pour l'obtention du titre de Docteur en Sciences du Sol .2009. Université Henri Poincaré, Nancy I.

[36]-**GADD, G.M.** Microbial formation and transformation of organometallic and organometalloid compounds. *FEMS Microbial.* 1993. **11**:297-316.

[37]- **JONER, EJ ; BRIONES, R ; LEYVAL, C .** Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant Soil* .2000. p. 227-234.

[38]-**DAVRANCHE, L ; HALUWYN, C ; CUNY, D.** *Approche du risque sanitaire liée à la consommation de champignons contaminés par les éléments traces métalliques.* Association pour la Prévention de la Pollution Atmosphérique, 2009. BP 86, 59373. Université Lille Nord de France.

[39]-**LEHEMBRE, F.** *Réponses adaptatives des microorganismes eucaryotes du sol aux pollutions métalliques.* Thèse de Doctorat .2009. Université Claude Bernard Lyon 1.

[40]- **TUZEN, M; OZDEMIR, M; DEMIRBAŞ, A.** Heavy metal bioaccumulation by cultivated *Agaricus bisporus* from artificially enriched substrates. *Lebens Unters Flersch.* 1998. **206**:417-419.

[41]-**GADD, G.M.** Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* .2004. **122**: 109– 119.

[42]-**AOUAM, A ; BOUKEBOUS, B.** *Impact de l'antimoine sur la croissance et l'activité enzymatique de souches fongiques isolées à partir des rhizosphères de deux plantes steppiques (Hedysarum pallidum et Lygeum spartum).* Mémoire de Master en biotechnologie des mycètes. 2012. Université Constantine 1.

[42]-**GADD.G.M.** Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological research* . 2007. **111** :3 -49.

[43]- **WHITE, C; WILKINSON, C; GADD, GM.** The role of microorganisms in biosorption of toxic metals and radionuclides. *Elsevier Science* .1995.P. 17-40.

[44]- **FOMINA ;M.A; ALEXANDER, I.J; COLPAERT, J.V ; GADD ,MG.** Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi .*Soil Biology and Biochemistry*.2013.**37**:P 851–866.

[45]-**BOUFELITA,F.Z ;BOUDRAA ,N.H.***Identification des souches fongique résistance à l'antimoine, isolées à partir de la rhizosphère d'Hedysarum pallidum desf de la région d'Ain-Babouche.* Mémoire de Master en biotechnologie des mycètes.2013. Université Constantine1.

[46]- **SUTJARITVORAKUL,T ; GADD GM; SUNTORNVONGSAGUL ,K;ANTHONY J.S. WHALLEY D, ROENGSUMRAN ,S; SIHANONTH,P.** Solubilization and transformation of insoluble zinc compounds by fungi isolated from a zinc min. *The international journal published by the Thai Society of Higher Education Institutes on Environment*.2013. P. 42-46.

[47]-**OUATTARA, A.** *lixiviation fongique des résidus miniers par A. niger et P. simplicissimum* . Thèse de Doctorat en génie civil.2008. Université Laval Québec.

[48]-**HAMADI, N** .*Effet du resveratrol sur les défenses antioxydantes chez les rats rendus diabétiques par l'injection de la streptozotocine.* Thèse de magistère en biologie cellulaire et moléculaire.2010. Université Constantine1.

[49]- **JOANNY, M.** Superoxide Dismutase (SOD), a Powerful Antioxidant,is now available Orally .*phytothérapie*. 2005. 3: 1-4 . *Paris,France*

[50]-**CORIAT, R.** *Applications d'une modulation pharmacologique des dérivés des formes réactives de l'oxygène pour une optimisation thérapeutique des patients traités par chimiothérapie.* Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé. 2012. Université Paris 5.

[51]- **REMON, E.** *Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques : vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution.* Thèse de Doctorat en biologie végétale. 2006. Université Jean Monnet.

[52]-**HARRAR, N.** *Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de Rhamnus alaternus.* Mémoire de Magister en Biochimie. 2012. Université Ferhat Abbas-Sétif.

[53]- **CHABORY, E.** *Caractérisation fonctionnelle de la glutathion peroxydase 5 murine.* Thèse de doctorat en physiologie et génétique moléculaires. 2009. Université Blaise Pascal.

[54]- **XIAOYAN, L ; XIAOHONG, X ; CHINGHONG, Y ; YUHUA, Z ; ZHIHONG, F ; YANGYANG, D .** Activities of antioxidant enzymes in three bacteria exposed to benzenesulfonate-methyl. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2009. **72** :1899–1904 .

[55]-**SOUGUIR, D.** *Modification métabolique, moléculaires et génotoxicité induites par le cadmium chez Vicia faba .* Thèse de Doctorat en sciences biologiques. 2009. Université Evuegne, France.

[57]-**AGNES, M ; BERNARD, C .** Production d'anticorps monoclonaux reconnaissant une catalase de *Scedosporium apiospermum*. *Groupe d'étude des interactions hôte-pathogène (UPRES EA-3142) et analyses biologiques et biochimiques.* 2013. Université Angers.

[58]- **BENBRINIS, S.** *Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de Santolina chamaecyparissus.* Mémoire de magister en biochimie et physiologie expérimentale. 2012. Université Ferhat Abbas, Sétif.

[59]- **CORDTS, M; RIDENOUR, N; HICKEY, M.** *The properties of enzymes: a study of catalase.* institué de biologie, 2008. Université Cornell.

[60]-**LIU,S ;YANG,Z ;WANG,X ;GAO,R ;LIU,X.2007.**Effects of Cd and Pb pollution of soil microbiota. *Frontiers of agriculture in china*,2007.1:85689.

[61]-**SRIVASTAVA, S; THAKUR, I.S .** Biosorption potency of *Aspergillus niger* for removal of chromium(VI). *Microbiol.* 2006.**53**: 232-237.

[62]- **BUCKOVA,M;GODOCIKOVA,J;POLEK, B.** Responses in the mycelial growth of *Aspergillus niger* isolates to arsenic contaminated environments and their resistance to exogenic metal stress. *J. Basic Microbiol.* 2007.**47**: 295–300.

[63]-**BAAZIZ,M ; QACIF,N ; BENDIAB, K ; AOUAD ,A.** Les Peroxydases des plantes : Aspect théorique et Applications pratiques . *Enzymologie Et Métabolisme*.2006.**618**:9-12.

[64]- **SZABADOS, L; SAVOURE ,A.** Proline: a multifunctional amino acid. *Biological Research Center*, 2009.**4** : 156-180.

[65]- **MATYSIK ,J ; BHALIA ;MOHANTY,P.** Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants.*the plant journal*.2002.**82**:525-532.

[66]-**SAVOURÉ ,A; BEN REJEB,K ;ABDELLY,C .** Proline, a multifunctional amino-acid involved in plant adaptation to environmental constraints.*journal de la Société de Biologie : Biologie Aujourd'hui*, 2013.**206** : 291-299 .

[67]- **ACHARD-JORIS, M.** *Etudes biochimiques et génétiques de la réponse adaptative de mollusques face aux contaminations métalliques et au stress oxydant.* Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur en ecotoxicologie. 2005.Université Bordeaux 1.

[68]-**ZAOUI ,L ; DJEBAR ,M . R.** Le stress oxydatif comme processus inducteur d'action toxique du Cadmium sur la Levure (*Saccharomyces cerevisiae*). *Les Technologies de Laboratoire*. 2011.**6**:.52-57.

[69]- **GUELFY, A; AZEVEDO,R ;LEA,P; MOLINA,S.** Growth inhibition of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* by cadmium: an antioxidant enzyme approach. *General and Applied Microbiology*. 2003; **49**:63-73.

[70]-MUKHERJEE, A; SENGUPTA,M.K;HOSSAIN, M.A; AHAMED, S;DAS,B; NAYAK, B;LODH, D;RAHMAN, M.M; CHAKRABORTI, D.R. Arsenic contamination in groundwater: a global perspective with emphasis on the Asian scenario. *J .Health Popul Nutr*;2006.**24(2)**:142-163.

[71]-SARITA, N; TABITHA ,M. Effect of heavy metals on cultural and morphological growth characteristics of halotolerant *Penicillium* morphotypes. *Journal of Basic Microbiology*. 2008.**48**: 363-369.

[72]-SUJOY, K.D; AKHIL, R.D ; ARUN, K.G.A study on the adsorption mechanism of mercury on *Aspergillus versicolor* biomass. *Environ. Sci. Technol* . 2007.**41** : 8281-8287.

[73]-LANFRANCO, L; BALSAMO,R; MARTINO, E; PEROTTO ,S et BONFANTE, P. Zinc ions alter morphology and chitin deposition in an ericoid fungus. *Eur. J. Histochem*. 2002.**46**:341-350.

[74]-STEPNIEWSKA,Z; WOLINSKA,A; ZIOMEK,J .2009. Response of soil catalase activity to chromium contamination. *Journal of Environmental Sciences* .**21**:1142–1147.

[75]-MUKHERJEE,A; DASB,D ; MONDALB,S.K ;BISWASB,R ; DASA,TK ; BOUJEDAINIC, N. Tolerance of arsenate-induced stress in *Aspergillus niger*, a possible candidate for bioremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.2010. **73**: 172–182.

[76]- CHAKRABORTY ,S ; MUKHERJEE,A ; KHUDA-BUKHSH,A.N. Cadmium-induced oxidative stress tolerance in cadmium resistant *Aspergillus foetidus*: it's possible role in cadmium bioremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.2014.**106**:46-53.

[77]- BENHAMDI,A ; BENTELLIS,A ; RACHED ,Q DU LAING,G ; MECHAKRA,A Effects of Antimony and Arsenic on Antioxidant Enzyme Activities of Two Steppic Plant Species in an Old Antimony Mining Area. *Biol Trace Elem Res*. 2014.**10** :1-9.

# *Annexes*

## I- Caractéristiques de la souche fongique testée (*Aspergillus sp*)

### ➤ Aspect macroscopique sur gélose Czapek-Dox

-aspect poudreux.

-face jaune claire avec têtes conidiennes jaunes.

-revers jaune.

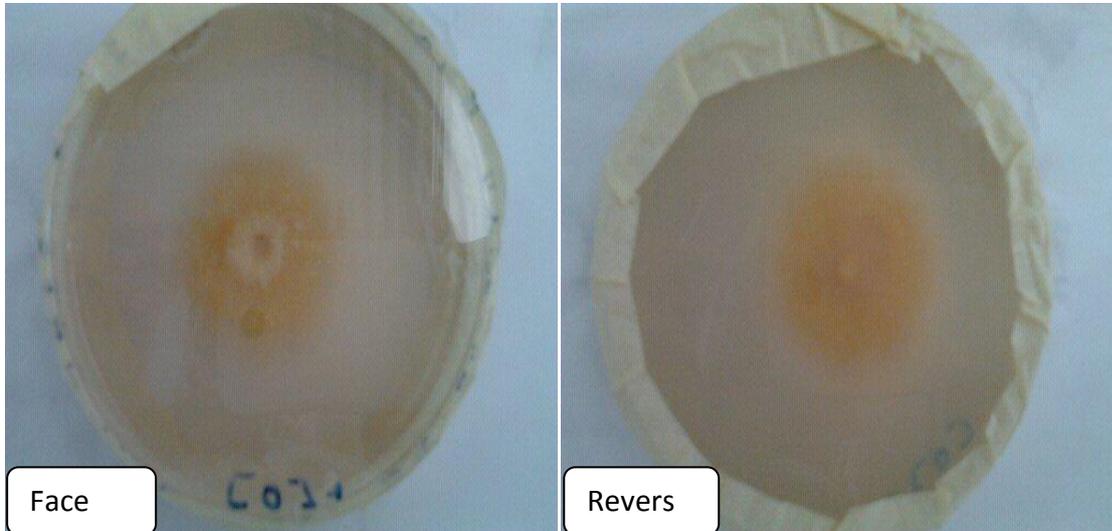


Figure 15 : Observation macroscopique de la souche *Aspergillus sp*

### ➤ Aspect microscopique :

-Thalle septé hyalin, conidiophore long et lisse.

-Vésicule sphérique, Têtes conidiennes bisériées.

-Conidies globuleuses hyalines.

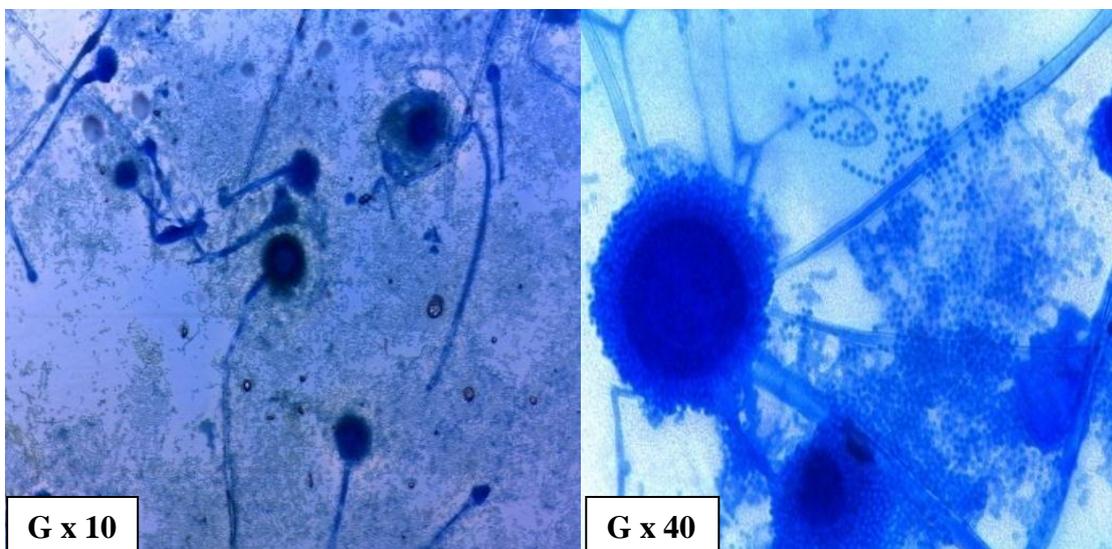


Figure 16 : Observation microscopique de la souche *Aspergillus sp*.

## II. Composition et préparation des milieux de culture

Ces milieux ont été préparés au sein du laboratoire de biologie et environnement

### II.1. Gélose Czapek-Dox

#### ➤ Composition

NaNo <sub>3</sub> .....	2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0.5g
KCL.....	0.5g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0.01g
Saccharose.....	30g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

PH=6.8+0.2 à 25°C.

#### ➤ Préparation

- Mettre tous les composés dans 200ml d'eau distillée.
- Laisser agir 10 minutes.
- Compléter le volume jusqu'à 1 litre.
- Mettre le tout sur une plaque chauffante agitateur de type J.P SELECTA jusqu'à homogénéisation.
- Répartir dans des flacons de 200ml, et autoclaver à 121°C pendant 20 minutes.

### II.2. Bouillon Czapek-Dox

#### ➤ Composition

NaNo <sub>3</sub> .....	2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0.5g
KCL.....	0.5g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0.01g
Saccharose.....	30g
Eau distillée.....	1000g

PH=6.8+0.2 à 25 °C.

#### ➤ Préparation

- mettre tous les composés dans 200ml d'eau distillée.
- Laisser agir 10 minutes.

-Compléter le volume jusqu'à 1 litre.

-Mettre le tout sur une plaque chauffante agitateur de type J.PSELECTA jusqu'à homogénéisation.

-Répartir dans des flacons de 200ml. Autoclavage à 121°C pendant 20 minutes.

### II.3. Bouillon Czapek-dox supplémenté en Pb à différentes concentrations

- Pour la préparation de la solution mère en Pb, dissoudre 1,656 g de Pb(NO<sub>2</sub>) dans 100ml d'eau distillée stérile de manière aseptique.
- La préparation des milieux de culture à différentes concentrations en métal se fait à partir de la solution mère de 50 mM de Pb dans 100ml bouillon Czapek-Dox.

**Tableau 1: préparation des milieux à différentes concentrations en Pb**

[Pb] mM	Témoin	5	2,5	10	7,5	15
Volume en mL						
Solution mère de Pb	0	10	5	20	15	30
Czapek-Dox	100	90	95	80	85	70

### II.4. Bouillon Czapek-dox supplémenté en Cd à différentes concentrations

- Pour la préparation de la solution mère en Cd, dissoudre 0,022 g de Cd Cl<sub>2</sub> 2.5H<sub>2</sub>O dans 100 ml d'eau distillée stérile de manière aseptique.
- La préparation des milieux de culture à différentes concentrations en métal se fait à partir de la solution mère de 1mM de Cd bouillon Czapek-dox.

**Tableau 2: préparation des milieux à différentes concentrations en Cd**

[cd] mM	Témoin	0,0025	0,005	0,0075	0,01	0,015	0,020	0,025
Volume en mL								
Solution mère de Cd	0	0,25	0,5	0,75	1	1,5	2	2,5
Czapek-Dox	100	99,75	99,5	99,25	99	98,5	98	87,5

## II.5. L'observation microscopique

Sur une lame propre et sèche, étaler le fixateur bleu de coton et à l'aide d'une pince prendre la lame et faire passer légèrement sur la flamme. Puis à l'aide d'une anse de platine (ou par la méthode de scotch) prélever une partie de mycélium de la souche fongique à observer et la déposer sur la lame puis mettre dessus une lamelle en évitant la formation de bulle d'air pour ne pas empêcher l'observation. Répéter cette opération au minimum 2 fois.

Enfin observer au microscope à différents grossissements.

## II.6. Dosage des systèmes de détoxification enzymatiques et non enzymatiques

### II.6.1. Dosage de la catalase (méthode de CHANCE et MACHLY (1967) [77].

#### ➤ Préparation de l'extrait enzymatique :

Après fermentation de 8 jours, ajouter 0,5ml de triton (X100) à la culture obtenue pendant 24h à 4°C puis réaliser une filtration avec papier Watman n°1 pour récupérer le filtrat (extrait enzymatique) et passer la biomasse au four à 60°C pour avoir le poids de la matière sèche de la biomasse après 3 jours de séchage.

#### ➤ Préparation de la solution tampon (phosphat buffer 0.01 M) pH=7 :

Cette solution est préparée de la façon suivante :

-solution (a)- 0,1361g de  $K_2HPO_4$  —————> 100 ml d'eau distillée.

- solution (b)- 0,2282g de  $KH_2PO_4$  —————> 100 ml d'eau distillée.

-Titrer (a) par (b) jusqu'à l'obtention d'un pH 7.

#### ➤ Préparation du substrat :

- Préparation  $H_2O_2$  20 mM : prendre 510  $\mu$ l  $H_2O_2$  et compléter le volume jusqu'à 100 ml de tampon à pH=7.

-Le substrat est obtenu par ajout de  $H_2O_2$  20 mM dans la solution tampon pH=7.

#### ➤ Préparation du réactif :

Ajouter 0,1mL de l'extrait enzymatique à 2.9 ml du Substrat (mélange tampon+ $H_2O_2$ ).

#### ➤ Lecture :

La lecture de l'absorbance par spectrophotométrie à 240 nm se fait 2 fois chaque 15 minute.

#### ➤ calcul :

Le calcul de l'activité spécifique de la Catalase se fait suivant la formule:

$$\text{Activité spécifique} = K / N$$

$$K=2.303 / T * \log A_0/A_1.$$

Soit ;

K : La vitesse de l'enzyme ; N : matière sèche ; T= intervalle de temps entre A<sub>0</sub> et A<sub>1</sub>(en minute) ; A<sub>0</sub> : absorbance à T<sub>0</sub> ; A<sub>1</sub> : absorbance à T<sub>1</sub>.

### II.6.2. Dosage de la proline (TROLL , LUIDSLEY, 1955) [42].

-100 mg de biomasse fraîche de chaque concentration métallique obtenue après fermentation de 8 jours.

- Ajouter 2mL de méthanol à 40%.
- Chauffage à 85°C dans un bain marie pendant 60min.
- Après refroidissement prendre 1ml de la solution d'extraction..
- Ajouter 2mL d'acide acétique, 25mg de ninhydrine et 1ml du mélange (120ml d'eau distillée, 300mL d'acide acétique, 80mL d'acide orthophosphorique).
- L'ensemble est porté à ébullition pendant 30 min au bain marie, la solution vire au rouge.
- Après refroidissement, 5mL de toluène est ajoutée.
- Après agitation au vortex, une pincée de (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) est ajoutée.
- Mesurer la Densité Optique  $\lambda= 528\text{nm}$ .
- Récupérer la biomasse fongique pour la détermination de la matière sèche. Cette dernière est obtenue en transférant les résidus de l'extraction dans une étuve à 85°C pendant 24h
- La teneur en proline est calculée suivant l'équation :

$$Y = 0,62 \times D.O / M.S$$

**D.O** : Densité Optique

**M.S** : Matière sèche

**Y** : teneur en proline en  $\mu\text{Mol/mg}$  de M.S

## ملخص

تلوث المواقع والتربة بالمعادن الثقيلة خاصة بسبب الرصاص أو الكاديوم يشكل خطرا كبيرا على جميع الكائنات الحية في التربة مثل الكائنات الحية الدقيقة.

يركز عملنا على دراسة سمية الرصاص أو الكاديوم بتركيزات مختلفة على نمو فطر *Aspergillus sp* وعلى نشاط الكاتالاز (catalase) وإنتاج البرولين (proline).

نتائجنا تظهر أن عند السلالة *Aspergillus sp* الرصاص و الكاديوم سامين. هذه السمية تترجم بـ انخفاض في عدد المستعمرات وتغيرات في الخصائص المظهرية والمورفولوجية (مظهر الفطر ، عدد وشكل الجراثيم ...). درجة سمية الكاديوم أعلى من الرصاص مهما كانت حالة الوسط (صلبة أو سائلة) : CMI لأجل الرصاص هو 15mM في كلا الوسطين و CMI عند الكاديوم هـ ي 0.025 mM في الوسط الصلب (gélose Czapek –Dox) و mM 0,015 في الوسط السائل (bouillon Czapek –Dox).

وأشارت اختبارات السمية لهذه المعادن الثقيلة على نشاط الكاتالاز وإنتاج البرولين من قبل *Aspergillus sp* أن الرصاص و الكاديوم يمكن أن يعطلا أو يهجع المسارات الأيضية لهذه السلالة و في هذه الحالة يسببان تحفيزا أو انخفاض في نشاط الكاتالاز وإنتاج البرولين عند تركيزات معينة.

## Abstract

Pollution sites and soils with heavy metals especially by lead or cadmium poses a significant threat to all living organisms in the soil such as microorganisms. Our work focuses on the study of the toxicity of lead or cadmium at different concentrations on the growth of *Aspergillus sp* and the catalase activity and the production of proline.

Our results show that for *Aspergillus sp*, lead and cadmium are toxic .This toxicity results in a decrease in population and changes in cropping and morphological characteristics (appearance of the mycelium, the number and shape of the spores ...).

The degree of toxicity of cadmium is higher than that of lead whatever the state of the culture medium (solid or liquid): the MIC for the Pb is 15 mM in both media and for Cd is 0.025 mM to Czapek-Dox agar and 0.015 mM on Czapek-Dox broth. .

Toxicity tests of these heavy metals on catalase activity and production of proline by *Aspergillus sp* indicated as lead and cadmium can disrupt or inhibit metabolic pathways and this strain induced a stimulation or a reduction in activity of catalase and production of proline at certain concentrations.

**BENABDELLAH IBTISSEM**

**KOUADRA HAKIMA**

**Date de soutenance : 25/06/2014**

**Titre : Impact du plomb ou du cadmium sur la croissance et sur quelques systèmes de détoxification d'une souche *d'Aspergillus sp.***

**Nature du Diplôme : Master en Microbiologie Générale /Option: Biotechnologie des mycètes ,fermentation et production de substance fongique.**

**Résumé :**

La pollution des sites et des sols par les métaux lourds en particulier par le Plomb ou le Cadmium représente un risque important pour tout organisme vivant dans le sol notamment les microorganismes.

Notre travail porte essentiellement sur l'étude de la toxicité du Plomb ou du Cadmium à différentes concentrations sur la croissance *d'Aspergillus sp* et sur l'activité de la catalase ainsi que sur la production de la proline.

Nos résultats montrent que pour la souche *Aspergillus sp* , le plomb et le cadmium sont toxiques Cette toxicité se traduit par une diminution de la population et par des modifications des caractères culturels et morphologiques (aspect du mycélium , le nombre et la forme des spores...)

Le degré de toxicité du cadmium est plus élevé que celui du plomb quelque soit l'état du milieu de culture (solide ou liquide) : la CMI pour le Pb est de 15mM dans les deux milieux et pour le Cd elle est de 0,025mM sur gélose Czapek –Dox et 0,015mM sur bouillon Czapek –Dox.

Les tests de toxicité de ces métaux lourds sur l'activité catalasique et sur la production de la proline par *Aspergillus sp* ont indiqué que le plomb et cadmium peuvent perturber ou inhiber les voies métaboliques de la souche et cela induit une stimulation ou une réduction de l'activité de la catalase et de la production de proline à certaines concentrations.

**Mots clés :** *Aspergillus*. croissance fongique. Métaux lourds : Plomb, cadmium. Toxicité. système de détoxification. activité enzymatique. Catalase. proline.

**Laboratoire de Biologie et Environnement. Université Constantine 1.**

**Encadreur : MOSBAH FAWZIA**

**tutrice : MEGHNOUS OUISSEM**

**Année Universitaire 2013-2014**

