



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم :

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

Intitulé :

Réponse antioxydante d'*Aspergillus niger* au stress induit par l'arsenic

**Présenté par : BOUDEFA Mouna
BOUKERB Lina Rayene
IMENASSEN Fouad**

Le : 14 /09 /2021

Jury d'évaluation :

Président du jury : BOULAHROUF Khaled (MCB- UFM Constantine).

Rapporteur : MEGHNOUS Ouissem (MAB- UFM Constantine).

Examinatrice : BOUCHERIT Zayneb (MAA- UFM Constantine).

*Année universitaire
2020- 2021*

Remerciements

On remercie en premier lieu notre Dieu qui nous a donné la force, la santé et la patience pour terminer ce travail. Notre reconnaissance s'adresse à Mme Meghnous Ouissem Maitre Assistante classe B à l'Université des Frères Mentouri- Constantine 1, qui a dirigé ce travail, de nous avoir si bien encadré, orienté et fait bénéficier de ses précieux conseils, sa riche expérience et de ses compétences. Ce fut un immense plaisir de travailler avec vous Docteur.

Nous tenons à remercier aussi tous les membres du jury Mr BOULAHROUF Khaled et Mme BOUCHERIT Zayneb de nous avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à l'ensemble du corps enseignants, depuis l'école primaire aux études supérieures pour toutes les connaissances qu'ils nous ont transmises. Il vous revient le mérite de nous avoir prodigué un enseignement profitable et une formation complète. Veuillez accepter nos remerciements les plus sincères.

Nous ne saurions oublier tous nos proches qui nous ont soutenus durant ces années. Un très grand merci à nos parents Merci pour tout, pour le soutien infailible dans les moments les plus compliqués, pour les encouragements depuis toujours, par ce travail, nous tenons à vous rendre hommage, car vous le méritez. Vos persévérances et vos sacrifices sont pour nous des exemples.

Merci à nos amies R. Rayane et R. Amira pour vos encouragements.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents,

À mon très cher père Fouzi pour tout ce qu'il a fait pour moi, par son soutien moral, ses encouragements, pour sa patience.

À ma très chère mère Malika, celle qui m'a appris la vie, le courage et l'amour pour son soutien moral, pour sa tendresse, et pour les encouragements qu'elle m'a donné pendant mon parcours, que Dieu le tout puissant garde mes parents et les protège.

À mes très chers frères : Youcef et Amir.

À ma cousine : Manel.

À Mouna, Chère Amie avant d'être mon binôme pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet. Puisse Allah vous donnez santé, bonheur, courage et surtout réussite.

Merci beaucoup.

Lina

Dédicaces

À la personne la plus chère à mon cœur Maman, qui a œuvré pour ma réussite, par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, qu'elle reçoit à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

À toi Papa rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuits pour mon éducation et mon bien être ; j'espère avoir répondu aux espoirs que tu as fondé en moi, que Dieu le tout puissant te garde santé, bonheur et longue vie pour que tu demeureras le flambeau illuminant mon chemin.

À mes frères Badro et Anis et ma sœur Nour.

À ma chère collègue dans ce travail Lina nous avons passé des bons moments ensemble que dieu garde notre amitié pour toujours.

Merci beaucoup.

MOUNA

Dédicaces

À Mes Très Chers Parents Ibrahim Imenassen et Fatiha Bechiche

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut, tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi. Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour.

À Mes Très chers Amis Aymen, Mohamed et Housseem

Veillez accepter l'expression de ma profonde gratitude pour votre soutien, encouragements et affection. J'espère que vous retrouverez dans ce travail, le témoignage de mes sentiments les plus sincères et de mes vœux de santé et de bonheur.

À tous ceux ou celles qui me sont chers et que j'ai omis involontairement de citer.

À tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

À tous ceux qui ont cette pénible tâche de soulager les gens et diminuer leurs souffrances.

FOUAD

Table des matières

Table des matières

Résumés

Liste des Abréviations

Liste des figures

Introduction générale	1
------------------------------------	---

1. Revue bibliographique

Chapitre 1 : les métaux lourds dans l'environnement

1. Pollution.....	3
1.1 Pollution par les métaux lourds.....	3
1.1.1 Contamination de l'environnement.....	3
1.1.2 Contamination des sols.....	3
2. Eléments traces métalliques dans l'environnement.....	4
2.1 Métaux lourds.....	4
2.2 Origine de la pollution par les métaux lourds.....	4
2.2.1 Sources naturelles.....	4
2.2.2 Sources anthropiques.....	5
2.3 Métalloïdes.....	5
2.3.1 Arsenic.....	5
2.4 Toxicité des métaux lourds.....	6
3. Métaux lourds et stress oxydatif.....	7
3.1 Conséquences du stress oxydant.....	8
3.1.1 Peroxydation lipidique.....	8
3.1.2 Oxydation des protéines.....	9
3.1.3 Dommages de l'ADN.....	10

Chapitre 2 : Remédiation

1. Techniques de remédiation.....	11
1.1 Approches physicochimiques.....	11
1.2 Phytoremédiation.....	11
1.3 Bioremédiation.....	13
2. Aspergellies.....	16

Table des matières

3. Mécanismes cellulaires de résistance et / outolérance des mycètes.....	17
3.1 Immobilisation du métal.....	17
3.1.1 Biosorption du métal.....	17
3.1.2 Bioaccumulation.....	18
3.1.3 Précipitation de composés métalliques sur des hyphes.....	18
3.2 Biotransformation du métal.....	19
3.2.1 Oxydoréduction.....	19
3.2.2 Biométhylation.....	20
3.3 Solubilisation du métal.....	20
3.4 Biovolatilisation.....	21
4. Mécanismes antioxydants.....	22
4.1 Systèmes antioxydants enzymatiques	23
4.1.1 Superoxydedismutase (SOD).....	23
4.1.2 Catalase (CAT)	24
4.1.3 Glutathion peroxydases (GPx).....	24
4.1.4 Peroxyredoxines (PRXs)	25
4.2 Systèmes antioxydants non enzymatiques.....	25
4.2.1 Glutathion(GSH).....	25
4.2.2 Vitamine E et Vitamine C.....	26
4.2.3 Proline.....	27

3. Matériel et méthodes

1. Introduction	29
2. Matériel biologique	29
2.1 Classification.....	29
2.2 Caractères cultureux d' <i>Aspergillus niger</i>	30
3. Préparation de la biomasse fongique.....	31
4. Préparation des échantillons pour l'analyse de l'arsenic.....	31
4.1 Analyse de l'arsenic.....	32
5. Dosage des biomarqueurs de toxicité.....	32
5.1 Préparation de l'extrait enzymatique.....	32

Table des matières

5.2 Mesure du malondialdehyde (MDA).....	32
5.3 Mesure de la superoxydedismutase (SOD).....	33
5.4 Mesure de la catalase (CAT)	33
3. Discussion générale.....	34
Conclusion et perspectives.....	41
Références bibliographiques.....	42
Annexes	

Résumé

La contamination des sols par les métaux toxiques est un problème environnemental généralisé résultant de l'industrialisation mondiale au cours des dernières années. Certaines techniques de remédiation pour détoxifier les sols sont présentées, en se concentrant sur l'utilisation de plantes présentant des capacités de survivre dans les sols contenant des métaux lourds ainsi que sur la fonction de certains microorganismes dans le processus de remédiation. L'objectif de cette étude est d'analyser et d'expliquer les mécanismes cellulaires et antioxydants d'*Aspergillus niger* pour la dépollution des sites pollués par l'arsenic. Les résultats montrent que l'effet toxique de l'arsenic sur *Aspergillus niger* s'est traduit par une diminution de sa croissance, cette même souche a accumulé dans sa biomasse des quantités importantes d'As mettant en évidence sa grande tolérance à ce métalloïde. En ce qui concerne les indicateurs du niveau de stress oxydants les résultats montrent que le MDA augmente avec l'augmentation des doses d'As dans le milieu de culture. Tandis que les activités antioxydantes de la CAT sont corrélées avec les doses d'arsenic, or les activités de la SOD ne le sont pas. Ces résultats suggèrent qu'*A. niger* a un potentiel d'accumulation d'arsenate et peut tolérer le stress oxydatif en développant des mécanismes de défense antioxydante, ce qui, confère à cette souche la capacité d'être exploitée pour l'élimination de l'arsenic des environnements contaminés.

Mots clés : Arsenic, *Aspergillus niger*, biomarqueurs de toxicité, réponse antioxydante, Bioremédiation

Abstract

Soil contamination with toxic metals is a widespread environmental problem resulting from global industrialization in recent years. Some remedial techniques to detoxify soils are presented, focusing on the use of plants the ability to survive in soils containing heavy metals as well as the function of certain microorganisms in the remediation process. The objective of this study is to analyze and explain the cellular and antioxidant mechanisms of *Aspergillus niger* for the remediation of sites polluted by arsenic. The results show that the toxic effect of arsenic on *Aspergillus niger* resulted in a decrease in its growth, this same strain accumulated in its biomass significant amounts of As showing its high tolerance to this metalloid. Regarding oxidative stress level indicators, the results show that MDA increases with increasing doses of As in the culture medium. While CAT antioxidant activities are correlate with arsenic doses, but SOD activities are not. These results suggest that *A. niger* has the potential to accumulate arsenate and can tolerate oxidative stress by developing antioxidant defense mechanisms, which gives this strain the ability to be exploited for the removal of arsenic from contaminated environments.

Keywords: Arsenic, *Aspergillus niger*, toxicity biomarkers, antioxidant response, Bioremediation

الملخص

يعد تلوث التربة بالمعادن السامة مشكلة بيئية واسعة الانتشار ناتجة عن التصنيع العالمي في السنوات الأخيرة. يتم تقديم بعض التقنيات العلاجية لإزالة السموم من التربة ، مع التركيز على استخدام النباتات القادرة على البقاء في التربة التي تحتوي على معادن ثقيلة وكذلك وظيفة بعض الكائنات الحية الدقيقة في عملية الاستعادة. الهدف من هذه الدراسة هو تحليل وشرح الآليات الخلوية ومضادات الأكسدة في *Aspergillus niger* لمعالجة المواقع الملوثة بالزرنيخ. أظهرت النتائج أن التأثير السام للزرنيخ على *Aspergillus niger* أدى إلى انخفاض في نموه ، وتراكمت نفس هذه السلالة في كتلتها الحيوية بكميات كبيرة مما يدل على تحملها العالي لهذا المعدن. فيما يتعلق بمؤشرات مستوى الإجهاد التأكسدي ، تظهر النتائج أن MDA يزداد مع زيادة جرعات As في وسط الثقافة. بينما ترتبط أنشطة مضادات الأكسدة CAT بجرعات الزرنيخ بينما نشاط SOD لا يأثر بأي ارتباط مع جرعات الزرنيخ. تشير هذه النتائج إلى أن *A. niger* لديه القدرة على امتصاص الزرنيخ ويمكنه تحمل الإجهاد التأكسدي من خلال تطوير آلية دفاع مضادة للأكسدة ، وهي خاصية يمكن استغلالها لإزالة الزرنيخ من البيئات الملوثة.

الكلمات المفتاحية:

الزرنيخ ، *Aspergillus niger* ، المؤشرات الحيوية للسمية ، الاستجابة المضادة للأكسدة ، المعالجة الحيوية

Liste des abréviations

AA : Acide ascorbique

AGPI : Acides gras polyinsaturés

As : Arsenic

CAT: Catalase

CD : Czapek-Dox

D EAA : D-erythroascorbate

EOA : Espèces oxygénées activées

ERO : Espèces Réactive de l'Oxygène

ETM : Eléments traces métalliques

GPX : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion réduit

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

MDA : Malonyldialdéhyde

PRXs : Peroxyredoxines

PVP : Polyvinylpyrrolidone

ROS : Reactive oxygen species

S.A.M : S-adénosylméthionine

SOD : Superoxyde dismutase

Liste des figures

Figure 01 : Schéma des différentes formes de ROS.....	6
Figure 02 : Schéma de la réaction de peroxydation lipidique.....	8
Figure 03 : Présentation de la phytostimulation.....	12
Figure 04 : Répartition des principales défenses antioxydantes dans les cellules (Mn-SOD) : superoxydedismutase mitochondriale, (Cu/Zn-SOD) : superoxydedismutasecytosolique, (GPx) : glutathion peroxydase, (GSH) : glutathion réduit.....	23
Figure 05 : <i>Aspergillus niger</i> sur milieu M2 (a) et <i>Aspergillus niger</i> sur milieu M2S5 (b).....	30
Figure 06 : Aspect microscopique (a) et représentation schématique du conidiophore d' <i>Aspergillus niger</i> (b).....	31
Figure 07 : Poids sec de mycélium d' <i>A.niger</i> cultivé avec différentes concentrations d'arsenate.....	35
Figure 08 : L'absorption intracellulaire d'arsénate par <i>A.niger</i>	36
Figure 09 : Contenu en MDA chez <i>A. niger</i>	37
Figure 10 : Activité du superoxyde dismutase (SOD) d' <i>A. niger</i>	38
Figure 11 : Activité de la catalase (CAT) d' <i>A. niger</i>	39

Introduction

Introduction

Les métaux et les métalloïdes existent naturellement dans le sol. Depuis le siècle dernier, le développement des activités industrielles et agricoles (pesticides, engrais, ...) a conduit à un apport intensif de ces éléments devenant des polluants environnementaux, même à de faibles concentrations, ils peuvent poser de graves problèmes de santé publique en raison de leur toxicité et de leur bioaccumulation (Vincent, 2004).

En raison de la géochimie et les activités humaines (principalement l'industrie et les anciennes mines), l'arsenic est, en effet, l'un des éléments métalliques les plus toxiques et c'est aussi le métalloïde le plus répandu dans l'eau et le sol (Manlius, 2009).

Certains métaux sont généralement toxiques même à de faibles concentrations, et par conséquent les micro-organismes sont les premiers organismes à être influencés par cette toxicité. Ces éléments peuvent provoquer divers effets nocifs, tels que l'allongement de la période de latence, l'inhibition de l'activité enzymatique, la modification de la structure de l'ADN, la modification de la composition et de la structure des populations microbiennes et aussi la réduction de la diversité microbienne (Habi, 2009). Il est également connu que l'arsenic induit directement un stress oxydatif en générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Provoquant des perturbations cellulaires, moléculaires et physiologiques chez divers organismes ; et par conséquent une activation d'antioxydants enzymatiques, à savoir la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion réductase (GR), la glutathion S-transférase, et la glutathion peroxydase (GPX) ainsi que des composés non antioxydants tels que l'ascorbate, le glutathion, les caroténoïdes neutralisant le stress oxydatif induit par la toxicité de l'arsenic (Sharma, 2012).

Pour pallier les problèmes de la pollution des environnements par les métaux lourds, plusieurs stratégies de remédiation ont été développées dont la bioremédiation, par le biais de l'utilisation de plantes ou de microorganismes (Ali *et al.*, 2011).

Les champignons sont un meilleur choix d'agents de bioremédiation en raison de leur haute tolérance à la toxicité des métaux lourds, de leur croissance rapide et de leurs excellentes propriétés liantes pour les métaux (*metal-binding*). En raison de leur cycle de reproduction court et de leur modification morphologique et génétique facile, ils peuvent être cultivés facilement en scale up (Meghnous, 2019).

Introduction

L'objectif de cette étude est de définir les potentialités de bioaccumulation et de la réponse antioxydante chez *Aspergillus niger* induite par la toxicité de l'arsenic, pour une éventuelle utilisation pour la bioremédiation des environnements pollués par l'arsenic. Ce travail est divisé en trois parties :

La première partie est consacrée aux notions bibliographiques qui comportent deux chapitres. Le premier chapitre, concernant les métaux lourds dans l'environnement et le stress oxydatif et le deuxième chapitre abordant les techniques de la remédiation et les mécanismes de la résistance fongique aux métaux lourds.

La deuxième partie expérimentale mettant au point le matériel et les méthodes utilisées pour définir les potentialités d'*Aspergillus niger* de biosorption d'arsenate et de sa réponse antioxydante induite par la toxicité de l'arsenic.

La troisième partie est une discussion générale, en se basant sur quelques résultats des travaux de Mukherjee *et al.* (2010), permettant d'évaluer la thématique de la recherche, vu les difficultés rencontrées pour l'application du protocole expérimental pour obtenir des résultats, donc on a eu recours aux résultats des chercheurs qui ont adopté la même méthode de recherche.

Enfin, ce travail est clôturé par une conclusion et des perspectives.

Revue bibliographique

Chapitre 1 : les métaux lourds dans l'environnement

1. Pollution

La pollution est l'ensemble des rejets de composés toxiques que l'homme libère dans l'écosphère, et qui entraînent une influence perturbatrice sur l'environnement. Cependant un accroissement important de la pollution de l'air, des eaux et des sols est provoqué par le développement des activités industrielles (Biteur, 2012).

1.1 Pollution par les métaux lourds

1.1.1 Contamination de l'environnement

La révolution industrielle et l'intensification de l'urbanisation ont conduit à la pollution de l'environnement par les métaux lourds et les métalloïdes, et en raison des activités humaines leurs concentrations dans l'air, le sol et l'eau continuent d'augmenter (Khan *et al.*, 2004 ; Taofeek *et al.*, 2012).

Ces éléments métalliques sont essentiellement non biodégradables et bio-persistants. Ils sont hautement écotoxiques et peuvent constituer une menace pour diverses formes de vie entraînant divers problèmes environnementaux : perturbations des écosystèmes les sols, les eaux de surface, les forêts et la dégradation des cultures. La principale cause de cette pollution est liée aux activités humaines, telles que l'exploitation minière et la fonte des minéraux (Rose *et al.*, 2018).

1.1.2 Contamination des sols

Le sol est un support de divers activités humaines comme l'industrialisation, l'urbanisation et l'agriculture, son rôle clé en matière d'environnement, il agit, comme un réacteur, un récepteur, un accumulateur et un filtre des pollutions (Hammadache *et al.*, 2016). Comparativement à l'air et à l'eau, le sol est le milieu qui reçoit la plus grande quantité d'éléments traces métalliques (ETM) des activités industrielles, il est considéré aussi comme et le lieu de réception et de stockage de ces éléments (Kabata-Pendias, 1995).

Le devenir des ETM dépendra de divers facteurs, tels que les paramètres physico-chimiques et biologiques du sol. Ces paramètres vont contrôler le processus d'adsorption à la

surface des particules solides (argile, minéraux, matière organique), la complexation avec des ligands organiques (Krika, 2014).

Le flux de sortie des ETM du sol est varié et difficile à évaluer. Les ETM peuvent atteindre la surface ou les eaux souterraines par le transfert horizontal ou vertical dans le sol, et ils peuvent être absorbés par les plantes ou les organismes du sol et les humains (Krika, 2014).

2 Éléments traces métalliques dans l'environnement

2.1 Métaux lourds

Les métaux lourds sont souvent appelés les éléments métalliques naturels, métaux ou non-métaux caractérisés par une densité élevée dans certains cas, supérieure à 5g/cm^3 (Hammadache *et al.*, 2016).

Le nom «métaux lourds» est un nom générique sans fondement scientifique ni nom légal (Adjia, 2012). La classification des métaux lourds est souvent débattue car certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement « lourds » (comme le zinc), et certains éléments métalliques toxiques ne sont pas des métaux (l'arsenic est un métalloïde) (Messia, 2014).

Ce sont des composants naturels de l'écorce terrestre présents en général en quantité très faible. C'est pour cette raison que les scientifiques les appellent «éléments traces métalliques (ETM)» (Benhamdi, 2014). Aussi les oligo-éléments peuvent être des métaux (Fe, Zn, Cu, etc.), des métalloïdes (As, B, Se) ou des non-métaux (N, F, Cl, Br) (Kebir, 2012).

2.2 Origine de la pollution par les métaux lourds

Le problème principal des métaux lourds tels que le plomb, le cadmium, le cuivre et le mercure est qu'ils ne peuvent pas être biodégradés, ils vont donc persister longtemps dans le sol, leur présence peut être naturelle ou anthropique (Kebir, 2012).

2.2.1 Sources naturelles

Les métaux lourds sont présents naturellement dans les roches, ils sont libérés lors de l'altération de celles-ci pour constituer le fond géochimique (Otmani, 2018).

La concentration naturelle de ces éléments métalliques dans les sols varie selon la nature de la roche, sa localisation et son âge (Baize, 2002).

Sous certaines conditions environnementales, les émissions naturelles des métaux lourds se produisent, telles ; les éruptions volcaniques, les vaporisations de sel de mer, et les incendies de forêt (Bounab *et al.*, 2015).

2.2.2 Sources anthropiques

En effet, la principale source de pollution est d'origine humaine. Les principaux types de pollution d'origine humaine sont : les émissions industrielles, les activités minières et agricoles, telles que l'utilisation de pesticides et de phosphates. La combustion de combustibles fossiles contribue également à libérer des métaux lourds dans l'environnement tels que le cadmium (Ali seid *et al.*, 2011).

2.3 Métalloïdes

Selon Benhamdi (2014), un métalloïde est un élément sous la forme d'un élément unique, qui n'a ni les caractéristiques métalliques ni non métalliques. Généralement, ils n'ont pas l'éclat dit métallique et sont de mauvais conducteurs électriques. Leur densité est relativement faible. Ils sont toujours chargés négativement et peuvent se combiner avec des métaux pour former des sels. Parmi les métalloïdes, on peut citer B, Si, Ge, As, Sb et Te.

2.3.1 Arsenic

L'arsenic est présent naturellement dans l'environnement. C'est un élément ubiquiste, c'est-à-dire qu'il existe dans l'atmosphère, les sols, les milieux aquatiques, les sédiments et les organismes vivants (**figure 01**) (Manlius *et al.*, 2009).

C'est un élément naturel se présente comme un métalloïde cristallin ayant le numéro atomique 33, solide acier et gris, se présente sous trois formes allotropiques qui sont le jaune, noire et le grise, dans le tableau périodique fait partie au groupe V avec une masse atomique de 74.92 u (g/mol) (Adriano, 2001) et ayant des propriétés intermédiaires entre les métaux et les non-métaux (Mandal *et al.*, 2002).



Figure 01 : un cristal d'arsenic retrouvé dans une mine au Japon (Peltier *et al.*, 2010).

Chimiquement, l'arsenic existe sous quatre valences : -3, 0, +3 et +5, mais sa forme élémentaire (0) est rare dans la nature. L'arsenic pentavalent est une forme stable trouvée dans les environnements contenant de l'oxygène (Boulanger, 2005).

Il est connu que les espèces inorganiques sont généralement plus toxiques que les espèces organiques, tandis que l'arsenite As(III) est plus toxique que l'arsenate As(V) (Manlius *et al.*, 2009).

La forme de l'arsenic dans l'environnement est très étudiée car elle permet de mieux mesurer les impacts et les risques environnementaux, car la nature de l'espèce affecte la biodisponibilité, la toxicologie, la mobilité et la bioturbation de l'arsenic (Campredon, 2014).

2.4 Toxicité des métaux lourds

Les métaux ne sont toxiques pour les organismes que lorsqu'ils existent sous forme libre, alors ils sont biodisponibles. Comme tout élément chargé positivement, les cations métalliques peuvent interagir avec toutes les particules organiques ou minérales chargées négativement dans le sol (Otmani, 2018).

Les métaux lourds ont un impact sur la population microbienne de diverses façons ; ils s'affectent : la densité, la taille, la structure des communautés (génétique et fonctionnelle) et également les activités enzymatiques (Huynh, 2009).

En général, les métaux entraînent une pression sélective pour augmenter la tolérance de base de certains microorganismes, mais réduisent la diversité biologique des microorganismes dans ces sols par rapport aux sols non contaminés (Pier-Anne, 2009).

Les éléments toxiques peuvent provoquer : des modifications de la structure des acides nucléiques et des protéines ; l'inhibition des réactions enzymatiques impliquant diverses fonctions métaboliques et des modifications de la perméabilité membranaire.

De plus, leur toxicité peut être liée à la carence secondaire en éléments essentiels provoquée par des quantités excessives d'éléments toxiques (Meghnous, 2020).

3. Métaux lourds et stress oxydatif

Le stress oxydant est défini comme la perturbation de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants, en faveur des premiers, conduisant à des dommages potentiels (Biteur, 2012).

Les métaux lourds ont la capacité de générer les ROS, leur action est liée aux capacités à exister sous différents états d'oxydation, en effet, le Fe, Cu, Cr ou Mn sont capables de céder un ou plusieurs électrons susceptibles de réduire l'oxygène et ses dérivés (Remon, 2006).

Par ailleurs, les métaux qui présentent un seul état d'oxydation comme le cadmium et le nickel, l'accumulation des ROS est induite pour trois raisons : une perturbation de certaines voies métaboliques, une inactivation et un « *down regulation* » des enzymes du système antioxydant ou un épuisement du stock de molécules de faible masse moléculaire (Mesnoua, 2016).

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS, ERO) sont des dérivés de l'oxygène dans lesquels certains électrons sont dans un état chargé et très actif. Ils représentent le type le plus important d'espèces réactives dans les organismes, et ils sont également la principale cause du stress oxydatif dans ces organismes (Valko *et al.*, 2007).

Les ROS peuvent être des espèces actives radicalaires de l'oxygène comme le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) et les peroxydes (ROO^{\bullet}), ou bien des espèces actives non radicalaires de l'oxygène tels que l'oxygène singulier (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou bien l'ozone (O_3) (**figur02**) (Benhamdi, 2014).

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) se forment de façon parasitaire dans les réactions biochimiques comportant le transfert d'électron ou la participation de l'oxygène

(Benavides *et al.*, 2005).

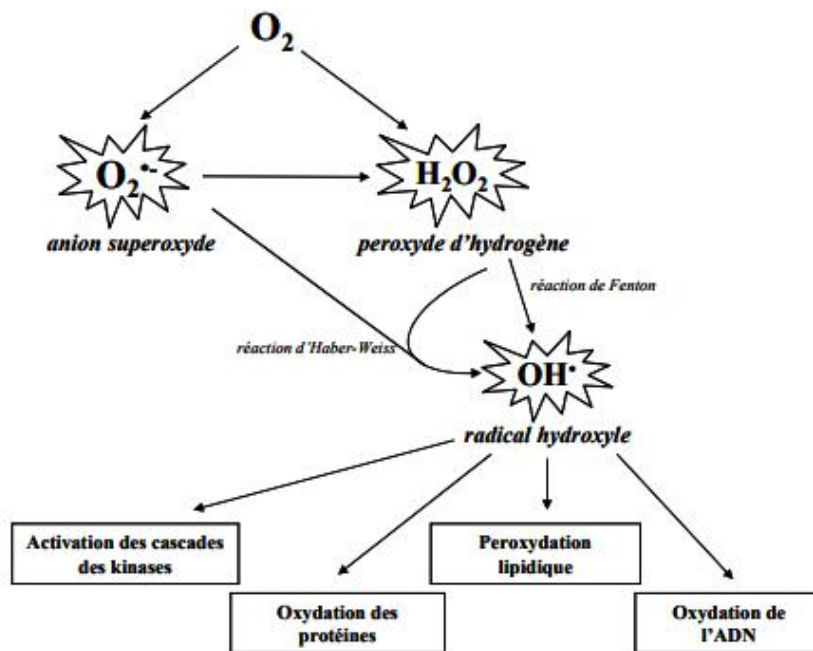


Figure 02 : schéma des différentes formes de ROS (Garait, 2006).

3.1 Conséquences du stress oxydant

3.1.1 Peroxydation lipidique

La cible principale des ROS sont les lipides, en particulier les lipides présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur haut degré d'insaturation (Garait, 2006).

L'oxydation des lipides produit des peroxydes lipidiques, eux-mêmes très actifs. La peroxydation lipidique entraîne des modifications de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (Garait, 2006).

L'oxydation des lipides est une réaction autocatalytique. Il s'agit d'une série de réactions radicalaires qui se déroulent en trois étapes. La première réaction génère des radicaux libres en éliminant l'hydrogène des acides gras (initiation). La réaction produit alors plusieurs radicaux libres en séquences (propagation), qui se combinent pour former des composés non radicalaires (terminaison) (Sylvie, 2003).

Par conséquent, la peroxydation lipidique fournit une variété de produits, dont certains peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE) qui ont été largement étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (Kehili, 2018).

3.1.2 Oxydation des protéines

L'oxydation des protéines est une modification covalente d'une protéine induite par les ROS, ou des sous-produits du stress oxydatif. La plupart des types d'oxydation des protéines sont fondamentalement irréversibles, tandis que certaines oxydations des protéines impliquant des acides aminés contenant du soufre sont réversibles. L'oxydation des protéines est très courante et souvent utilisée comme marqueur de diagnostic du stress oxydatif (Møller *et al.*, 2007).

L'oxydation des acides aminés induit des modifications structurales et une fragmentation des chaînes, ce qui affecte leurs fonctionnements et leurs activités (Valko *et al.*, 2007).

Ces modifications comprennent la rupture des liaisons peptidiques en modifiant les chaînes protéiques, la modification des peptides en ajoutant des produits de peroxydation lipidique et l'insertion directe des radicaux libres dans les groupes d'acides aminés des protéines (Kebsa *et al.*, 2020).

Les ROS ciblent beaucoup plus les acides aminés contenant des groupes thiols. La Cys et la Met sont assez réactives en particulier avec l'O₂ et le OH[•]. L'Oxygène actif peut céder un atome de H à partir du résidu de la cysteine pour former un radical thiyle qui se lie avec un autre radical thiyle pour former des ponts disulfures, l'oxygène peut aussi s'ajouter sur un résidu de méthionine pour former les dérivés de sulfoxyde de méthionine (Benhamdi, 2014).

3.1.3 Dommage de l'ADN

Le stress oxydatif provient principalement des mitochondries, ces organites sont les principales cibles des ROS. En effet, le génome mitochondrial est 10 fois plus sensible au stress oxydatif que le génome nucléaire (Garait, 2006).

Pour les plantes, les dommages d'ADN impliquent d'abord de traverser toutes les barrières de défense établies par les plantes, le potentiel de détoxification des cellules ou de l'organisme et, finalement, le potentiel du système de réparation de l'ADN. Divers effets peuvent alors être : (Biteur, 2012).

- Les cassures de brin d'ADN, qui peuvent être simple brin ou double brin.
- Une formation de bases oxydées.
- Une apparition d'adduits à l'ADN. Ils correspondent à la formation de produits d'addition entre le polluant et les nucléotides, suite à la peroxydation des lipides.
- Des pontages ADN-protéine.

Les attaques au niveau des bases sont variées. Par exemple, les radicaux hydroxyles attaquent la double liaison de la thymine en C5 ou C6 et éliminent rarement l'hydrogène du groupe méthyle. Le radical 6-hydroxythymine formé interagit avec $O_2^{\bullet-}$ pour produire de la thymine glycol, une base modifiée peut bloquer la réplication (Croteau *et al.*, 1997). Le stress oxydatif peut également causer des dommages indirects à l'ADN. C'est le cas de certains aldéhydes comme le MDA ou le 4HNE, qui forment des adduits prémutagènes du type MDA-dG ou des dérivés de l'éthylène (Niedernhofer *et al.*, 2003).

Chapitre 2 : Remédiation

En raison de l'industrialisation et de l'urbanisation rapide le problème des sols contaminés par les métaux lourds est devenu aujourd'hui l'un des problèmes environnementaux majeurs, la concentration de ces polluants posent un grave problème préoccupant (Chen *et al.*, 2015). Le besoin de comprendre les processus qui sont à l'origine de ces pollutions et de trouver des moyens possibles de dépollution est important, l'un de ces moyens est la remédiation qui signifie l'élimination des pollutions et des contaminants des milieux ambiants (Nouri, 2016).

Plusieurs technologies physiques et chimiques de la remédiation ont été utilisées mais elles sont devenues moins attractives en raison des besoins énergétiques élevés, coûts élevés, faible efficacité et difficultés opérationnelles (Ferry *et al.*, 2019).

Actuellement, certaines techniques basées sur l'utilisation des organismes vivants ont été rapportées comme des méthodes efficaces et économiques pour la dépollution de

l'environnement contaminé par les métaux lourds (Pathak *et al.*, 2019).

1. Techniques de remédiation

1.1. Approches physicochimiques

Il existe plusieurs méthodes physico-chimiques permettant la décontamination des sites pollués, les plus utilisées sont l'incinération et les méthodes de décomposition chimique (Mekricha *et al.*, 2019).

Le lavage des sols est l'une des techniques physiques les plus connues, cette technique est basée sur l'injection des fluides (d'acides fort ou par un chélateur) dans le sol afin de transférer et concentrer les polluants vers des points de récupération, et réalisée par des pressions variables : normales ou hautes (Nouri, 2016).

L'extraction par les solvants est l'une des techniques chimiques les plus simples à utiliser, qui a un faible cout et donne de meilleurs résultats; les solvants organiques comme les alcanes, les alcools ou les cétones sont les plus utilisés permettant de dissoudre la plupart des polluants organiques toxiques (Perchet, 2008).

1.2 Phytoremédiation

La phytoremédiation est une technique basée sur l'utilisation des végétales (herbacées, plantes, arbustes et arbres) qui sont capables de bloquer, extraire, accumuler, transformer ou de détruire un polluant, cette technique est utilisée pour la décontamination des sols, des boues, des sédiments, des effluents liquides ou gazeux contaminés par différents polluants en l'occurrence les métaux lourds (Ademe, 2006).

La Phytoextraction c'est une technique basée sur l'utilisation des plantes qui ont la capacité d'accumuler certains métaux lourds, ces plantes sont dites hyper-accumulatrices où l'accumulation de des métaux est concentrée vers les parties aériennes et récoltables (feuilles et tiges) (Liphadzi *et al.*, 2005). Le principe de la phytoextraction c'est d'avoir des plantes spécifiques sur des terrains contaminés par les métaux lourds et de récolter ces plantes chaque année (Zang *et al.*, 2018). L'avantage que présente cette technique c'est son faible cout.

La rhizofiltration est une technique utilisant des plantes aquatiques qui sont capables

d'absorber, concentrer et précipiter les polluants organiques ou inorganiques. Giasson (2005) rapporte que les plantes aquatiques sont petites, poussent lentement et elles ont des concentrations très élevées en eaux, ce qui présente un inconvénient pour l'utilisation de cette technique étant un moyen de remédiation.

La Phytostimulation est basée sur l'intervention des microorganismes associés aux racines des herbes, ces plantes sécrètent des exsudats racinaires (O_2 , sucres, alcools et acides) qui peuvent être utilisés par les communautés microbiennes et promouvoir leur développement et leurs activités (**figure 03**). Cette stimulation microbienne dans la rhizosphère a pour fonction de dégrader les substances toxiques organiques (solvants, produits phytosanitaires) (Remon, 2006).

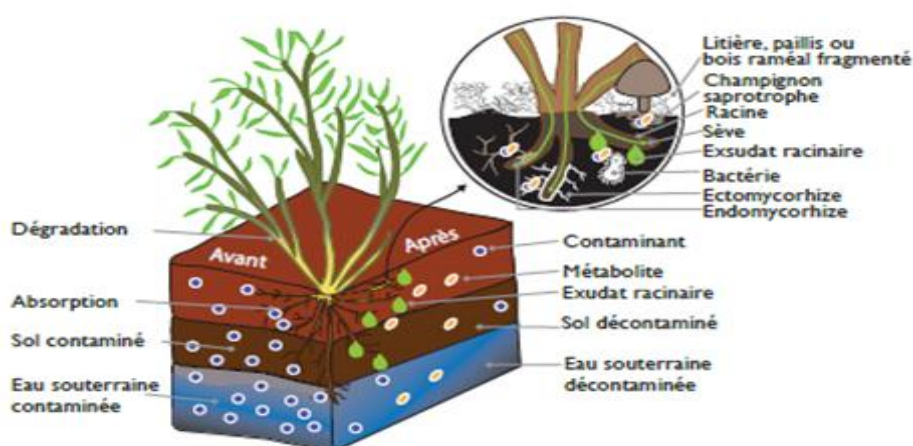


Figure 03 : présentation de la phytostimulation (Hénault-Ethier, 2016).

La Phytostabilisation consiste à réduire la mobilité des polluants essentiellement métalliques (par adsorption, précipitation et maintien physique ou confinement) afin de prévenir leur migration (biodisponibilité, lessivage, réenvoles) vers les nappes phréatiques en limitant l'érosion et le lessivage des sols (Wu *et al.*, 2011). Le principe de la phytostabilisation est que les racines végétales vont sécréter des exsudats qui peuvent altérer la chimie du sol et provoquer une précipitation des polluants, les rendant moins toxiques et plus stables (Math *et al.*, 2016). Cette technique ne permet pas de dépolluer les sites ou les sols mais constitue un mode de gestion destiné à maîtriser les risques *via* la stabilisation des éléments traces du sol (Nguemte, 2019).

La phytotransformation également connue sous le nom phytotransformation, c'est l'utilisation des capacités métaboliques de certaines plantes pour dégrader et transformer

complètement des polluants organiques contenus dans les sols ou dans l'eau (Kerfaoui, 2015). Les polluants sont donc absorbés et dégradés par la plante, pour ensuite être métabolisés pour sa propre croissance (Roy *et al.*, 2007). Cette dégradation peut avoir lieu dans la plante ou en dehors de la plante *via* la production d'enzymes extra racinaires (exsudats) (Colombano *et al.*, 2010).

La Phytovolatilisation implique l'assimilation et l'évaporation des contaminants organiques et inorganiques (les métaux lourds volatiles : Hg, Pb, As et Se) par les plantes (Repellini *et al.*, 1999). Le principe de cette technique est de prélever ces polluants solides ou liquides est les transformés en gaz, ces derniers seront absorbés par la plante et éliminés par évapotranspiration (Giasson, 2005).

1.3 Bioremediation

La bioremédiation est une méthode de dépollution des sites contaminés par les polluants industriels ; elle est fondée sur l'utilisation des agents biologiques, pour une option avantageuse à diminuer la pression exercée par les polluants sur l'environnement (Romdhane, 2011). Le principe de la bioremédiation consiste à utiliser la capacité des microorganismes (principalement champignons et bactéries) présents naturellement dans le sol ou bien intégrées au milieu, pour dégrader et transformer les polluants en CO₂ et en eau, la bioremédiation se déroule dans des conditions aérobies ou anaérobies (Abdelly, 2019).

La bioremédiation doit se faire dans un environnement hétérogène dans lequel les polluants sont en association avec les particules du sol, et pour cela elle doit avoir une approche pluridisciplinaire (Geoffrey, 2008).

La mycoremédiation fait partie des techniques de la bioremédiation, c'est une technique initialement inventée par Paul Stamets ; elle est basée sur l'utilisation d'une ou plusieurs espèces fongiques pour restaurer et épurer un système écologique contaminé par un ou plusieurs polluants (Mani *et al.*, 2014).

La mycoremédiation est utilisée pour la dépollution *in-situ* des colorants, des herbicides, des médicaments pharmaceutiques et des métaux lourds (Akhtar *et al.*, 2020).

Les champignons ont des avantages majeurs comparativement aux bactéries, ils sont présentés par la capacité des champignons de se propager dans le sol grâce à leur mycélium et

Revue bibliographique

à produire des enzymes extracellulaires à large spécificité de substrat (Verdin *et al.*, 2004).

Etant donné qu'une bioremédiation efficace nécessite l'action d'enzymes microbiennes pour transformer les contaminants en composés non toxiques, l'optimisation des conditions permettent aux populations microbiennes de les dégrader rapidement (Da Silva *et al.*, 2020).

L'utilisation des microorganismes pour la remédiation des polluants est influencée par de nombreux facteurs : le type de polluant, les conditions environnementales et la présence de source d'azote et de phosphore (Yadav *et al.*, 2021).

Roger et Jaq (2000) rapportent : « il existe deux méthodes majeures de bioremédiation selon le type d'application : les méthodes *ex-situ* traitant le sol qui a été excavé et transporté vers un centre de dépollution. Quant aux méthodes *in-situ* sont le traitement du sol sur le site même sans excavation ». De même le type de contaminant est considéré le facteur principal pour déterminer quelle méthode de bioremédiation utilisée (Chibueze *et al.*, 2016).

Les techniques de bioremédiation sont subdivisées en huit catégories selon le principe biologique ou mode de dépollution : La biodégradation, la biolixiviation, la biorestoration, la bioaugmentation, et la biostimulation (Abdelly, 2019).

La biodégradation est le processus par lequel des substances organiques sont décomposées par des microorganismes (bactérie ou champignon) en substances plus simples (Krasmy, 2016). Lorsque la biodégradation est terminée, le processus est appelé "minéralisation". Cependant, dans la plupart des cas, le terme biodégradation est généralement utilisé pour décrire tout changement à médiation biologique dans un substrat (Bennet *et al.*, 2002).

Les microorganismes transforment les substances par deux processus la croissance et le cométabolisme :

En croissance, un polluant organique est utilisé comme seule source de carbone et d'énergie. Ce processus entraîne une dégradation complète (minéralisation) des polluants organiques. Le cométabolisme est défini comme le métabolisme d'un composé organique en présence d'un substrat de croissance qui est utilisé comme principale source de carbone et

d'énergie (Frtsche *et al.*, 2008).

Les processus de biodégradation varient considérablement, mais le produit final de la dégradation est souvent le dioxyde de carbone (Pramila *et al.*, 2012).

La biolixiviation est l'extraction des métaux de leurs minerais grâce à l'utilisation d'organismes vivants ; la biolixiviation est l'une des nombreuses applications de la biohydrométallurgie et plusieurs méthodes sont utilisées pour récupérer le cuivre, le zinc, le plomb, l'arsenic, l'antimoine, le nickel, le molybdène, l'or, l'argent et le cobalt (Morin, 2010).

Plusieurs espèces de champignons peuvent être utilisées pour la biolixiviation grâce à leurs avantages de la biodisponibilité qui peuvent être cultivés sur de nombreux substrats différents. Des expériences ont montré que deux souches fongiques *Aspergillus niger*, et *Penicillium simplicissimum* étaient capables de mobiliser une grande variété de métaux lourds (Hubau, 2020).

La biorestauration est une technique de la bioremédiation utilisée pour attaquer les polluants spécifiques du sol, elle a pour objectif de faciliter, accélérer et augmenter la dégradation des hydrocarbures en CO₂ et H₂O brut (Floch, 1996).

La biorestauration présente comme principal avantage qu'elle est réalisée par des micro-organismes indigènes, qui sont déjà présents et qui sont donc bien adaptés au milieu. Or, son principal inconvénient vient de ce que l'ajout d'additifs est tributaire de la géologie locale du milieu en subsurface (Charissou *et al.*, 2009).

La bioaugmentation est l'utilisation des microorganismes supplémentaires capables de produire des enzymes à large spectre, dont l'objectif est l'amélioration de la biodégradabilité des composés organiques (Alvarez *et al.*, 2011).

Cette technique offre plusieurs avantages comme par exemple l'assainissement des contaminants *in situ* réalisé avec un minimum d'impact sur l'écosystème en surface, un minimum de production de déchets après traitement, et un moindre coût par rapport à d'autres options *ex situ* (Zawierucha *et al.*, 2011). Certaines limites existent comme la présence de certains co-contaminants qui peuvent empêcher l'action des microorganismes (Da Silva *et al.*, 2010).

La biostimulation est l'une des techniques les plus utilisées du fait de son faible coût et que ne nécessitant pas l'adjonction des microorganismes spécifiques sélectionnés (Bourdier, 2005).

Cette technique est basée sur l'utilisation des microorganismes qui sont associés aux plantes au niveau racinaire pour améliorer et favoriser l'absorption des nutriments et la tolérance aux stress abiotiques (Turner, 2018).

2. Aspergellies

Les champignons représentent l'un des plus importants groupes d'organismes sur terre et jouent un rôle clé dans un grand nombre d'écosystèmes (Mueller *et al.*, 2007). Ce sont des organismes eucaryotes à mode de reproduction sexuée ou asexuée, tous les champignons ont une paroi constituée de chitine et de polysaccharide très résistant (St-Germain, 2021).

D'un point de vue structural, on trouve une grande variété de champignons. Ils sont classés en deux grandes catégories : la forme levure unicellulaire et la forme mycélienne pluricellulaire constituée d'hyphes (Redecker, 2002).

Les champignons filamenteux synthétisent leurs propres nutriments à partir de l'eau et des éléments nutritifs et minéraux qu'ils puisent dans leur environnement. Ils jouent un rôle important dans le recyclage des matières organiques en puisant leur énergie à partir de ces sources carbonées externes (Lecellier, 2013).

Parmi ces champignons filamenteux, le genre *Aspergillus*, comprend plus de 260 espèces ; ce sont des champignons cosmopolites, répandus du milieu extérieur. Il est affilié à la classe des Ascomycètes, l'ordre des Eurotiales et la famille des Trichocomacées (Samson *et al.*, 2009).

Beaucoup d'espèces fongiques telles que *Rhizopusarrhizus*, *Mucormiehei* et *Aspergillus niger* ont été largement étudiés pour la sorption de métaux lourds ; leurs parois contiennent une grande quantité de polysaccharides et des protéines, offrant de nombreux groupes fonctionnelles pour la fixation des ions métalliques (Taylor *et al.*, 2009).

3. Mécanismes cellulaires de résistance et / ou tolérance des mycètes

Selon les conditions et selon les microorganismes, la résistance aux métaux se traduit par la réponse cellulaire microbienne qui peut soit mobiliser, soit immobiliser, soit transformer les métaux lourds. Ces différents processus peuvent être exploités en bioremédiation (Hazen *et al.*, 2005).

En général, la tolérance des champignons aux métaux lourds suggère deux mécanismes : la séquestration extracellulaire (chélation et liaison de la paroi cellulaire) et la séquestration intracellulaire, liée aux protéines ou à d'autres ligands pour empêcher les dommages métalliques des cibles cellulaires sensibles (Anahid *et al.*, 2011).

3.1 Immobilisation du métal

3.1.1 Biosorption du métal

La biosorption est un processus pouvant être définie comme la capacité des matières biologiques à accumuler des métaux lourds par des voies métaboliques ou par des voies physico-chimiques spontanées d'absorption, ou comme une caractéristique de certains types de biomasse microbienne non vivante qui concentrent les métaux lourds à partir des solutions aqueuses même très diluées (Shamim, 2018).

Les principaux facteurs affectant le processus de biosorption sont : la concentration initiale d'ions métalliques, la température, la valeur du pH et la concentration de biomasse dans la solution. La température comprise entre 20 et 35°C n'affecte pas le processus de biosorption. Cependant, le pH semble être un processus important pour la biosorption, il affecte la chimie en solution des métaux, l'activité des groupes fonctionnels dans la biomasse et la compétition des ions métalliques (Nilanjana *et al.*, 2008).

Les biomatériaux tels que les champignons sont avérés efficaces et économiques pour éliminer les métaux toxiques des solutions aqueuses diluées par la biosorption, car la paroi cellulaire fongique présente le pourcentage le plus élevé des composants de la biomasse fongique présentant d'excellentes propriétés de fixation des métaux (Nilanjana *et al.*, 2008).

Dans certain cas, la quantité des métaux accumulée à la surface cellulaire des organismes morts est supérieure à celle des organismes vivants (Malayeri, 1995).

La biomasse fongique morte d'*Aspergillus niger* recouverte avec des ions de Fe à montré une élimination maximale environ 95% d'As⁺⁵ et 75% d'As⁺³ à pH 6. Aucune interaction n'a été observée entre la charge de la surface de la biomasse et l'élimination de l'As (Meghnous, 2020).

3.1.2 Bioaccumulation

La bioaccumulation des métaux lourds est un processus physiologique normal, ou la conséquence d'une surcharge accidentelle de l'organisme, dans les deux cas les cellules utilisent le plus souvent leurs structures habituelles pour immobiliser les ions, et possèdent une variété de ligands suffisante pour complexer un grand nombre d'éléments de la classification périodique (Bayou *et al.*, 2012).

En effet, la bioaccumulation par les champignons vivants est un système auto-renouvelable par la croissance de ces microorganismes.

Dans ce système, l'immobilisation métallique se fait par la modification chimique *via* le transport intracellulaire, grâce à la dégradation enzymatique des composés organométalliques ou par la synergie de plusieurs microorganismes (Benabdallah *et al.*, 2014)

3.1.3 Précipitation de composés métalliques sur des hyphes

La précipitation des métaux lourds est définie comme le passage des métaux de l'état dissout à l'état solide ; ces derniers se précipitent sous forme d'hydroxyde, de carbonates, de phosphates ou de sulfures (Deschamps *et al.*, 2006).

De nombreuses espèces bactériennes et fongiques ont les capacités de métaboliser des substances influençant la mobilité des métaux lourds dans le sol (Belouchrani *et al.*, 2013). Les métabolismes des microorganismes (cas des bactéries sulfato-reductrices) résultent indirectement de la précipitation des métaux ; par conjugaison d'une alcalinisation du milieu et de la production d'hydrogène sulfuré (Michel *et al.*, 2000).

Les mécanismes de tolérance biologique impliqués dans la survie des champignons comprenant la précipitation, complexation et cristallisation d'espèces métalliques par exemple l'oxydation, la réduction, la méthylation et la biosorption sur les parois cellulaires, les pigments et les polysaccharides extracellulaires conduisant à la diminution du transport,

l'imperméabilité, l'efflux et la précipitation des métaux (Gadd, 1993).

Les champignons de la pourriture blanche peuvent concentrer les métaux prélevés sur le substrat dans leur mycélium, les métaux qui entrent dans la cellule peuvent également influencer la production des enzymes extracellulaires (Baldrian, 2003).

Khozani *et al.* (2020) ont démontré que plusieurs espèces fongiques des phylums Ascomycota et Basidiomycota, et en particulier les espèces d'*Aspergillus* produisent des laccases (enzyme d'oxydation) à partir du tanin comme source de carbone, l'objectif principale est l'élimination des métaux par précipitation ; l'effet de cette enzyme sur la précipitation des métaux est nouveau et signalé pour la première fois.

Néanmoins, les processus de précipitation peuvent être très efficaces car initialement ils reposent sur des produits de solubilité et dans un premier temps sur l'efficacité de séparation solide-liquide (Eccles, 1995).

3.2 Biotransformation du métal

De nombreux microorganismes peuvent transformer une variété de métaux et de métalloïdes par une oxydation, une réduction et une méthylation. Ceci conduit à des changements de la mobilité et de la toxicité envers d'autres organismes vivants (Gharieb *et al.*, 1999).

3.2.1 Oxydoréduction

Les microorganismes peuvent mobiliser les métaux, les métalloïdes et les composés organométalliques par le processus de réduction et d'oxydation (Gadd, 2004).

Bien que l'influence des conditions oxydoréductrices du sol apparaisse très importante à l'égard de la mobilité des éléments métalliques, il n'en demeure pas moins que ce facteur apparaît souvent comme secondaire par rapport au pH. En effet, pour un sol donné l'Eh varie en fonction inverse du pH, il augmente quand le pH diminue (Deneux-Mustin *et al.*, 2003).

De plus, la modification du degré d'oxydation des ligands ou des éléments s'associant avec le métal influence indirectement la solubilité des métaux lourds. Par exemple, en

conditions réductrices, les sulfates sont réduits en sulfure qui piègent les éléments métalliques par exemple Pb, Cd, Zn (Deneux-Mustin *et al.*, 2003).

3.2.2 Biométhylation

La biométhylation est une réaction chimique correspondant au transfert à partir d'un donneur de méthyle d'un groupement méthyle grâce à une enzyme appelée méthyltransférase (Anger *et al.*, 2005).

Les principaux donneurs biologiques sont la méthylcobalamine, impliquée dans la méthylation du mercure, de l'étain et du plomb, et la S-adénosylméthionine (S.A.M), impliquée dans la méthylation de l'arsenic et sélénium (Gadd, 1993).

Généralement, la biométhylation est considérée comme une détoxification des substances inorganiques telles l'arsenic (Li *et al.*, 2018). De nombreuses espèces bactériennes et fongiques sont capable de méthylées, les composés de l'arsenic comme l'arsenate [As(V)], arsenite [As(III)], et acide méthylarsoniqueaux volatils : diméthyl ou triméthylarsine (White *et al.*, 1995).

3.3 Solubilisation du métal

La solubilisation peut être issue de la production de composés acides tels que les acides carboxyliques, phénoliques, aliphatiques, nitrique et sulfurique (Huynh, 2009).

Par conséquent le processus de solubilisation des minéraux métalliques toxiques par les champignons devrait donc être pris en compte dans le cadre de tolérance aux métaux de ces organismes (Fomina, 2005).

La solubilisation des métaux est assurée par les protons (ions H^+) libérées dans le sol et les complexes organiques, qui peuvent agir seuls ou en combinaison. Les composés organiques impliqués dans ce mécanisme font généralement partie du groupe de molécules organiques de faible poids moléculaire contenant des groupes carboxyle actifs ou phénol, tels que les acides organiques, les biosurfactants et les sidérophores (Benabdallah *et al.*, 2014).

Ces molécules favorisent le mouvement des éléments métalliques et se propagent aux plantes où ils s'accumulent (Huynh, 2009).

Revue bibliographique

Cependant les champignons et les racines des plantes excrètent eux aussi des acides afin d'augmenter leur absorption de nutriments, ou tout simplement comme déchets métaboliques cette acidification favorise la mobilité des autres éléments qui ne sont pas indispensables pour le métabolisme végétal (Deneux-Mustin *et al.*, 2003).

Quatre mécanismes de solubilisation des composés solides métalliques chez les champignons ont été observés :

- 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 mycélage comme une capture, un emprisonnement des ions métalliques).

Les trois premiers mécanismes se produisent par des protons et des acides organiques excrétés par les champignons. Le quatrième processus peut être observé si les champignons accumulent union 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 (Ouattara, 2008).

3.4 Biovolatilisation

La volatilisation est basée sur l'effet direct de certains microorganismes sur le degré d'oxydation des substances métalliques. C'est le cas du mercure, de l'arsenic du sélénium et de l'antimoine. La biométhylation peut transférer des groupes méthyles directement aux atomes, Pb, Sn, As, Sb et Se, les faisant ainsi se volatiliser dans l'atmosphère (Huynh, 2009).

La biovolatilisation est un processus naturel dans lequel l'arsenic est perdu dans le sol ou l'eau (Jakob *et al.*, 2010).

Les moyens qui peuvent également être considérés comme une bioremédiation de l'arsenic volatil sont la réduction enzymatique et inorganique de l'arsenic par l'arsenic (V) en As (III) et une série de réactions de méthylation (Liu *et al.*, 2011).

L'arsenic dans le sol peut être converti en dérivés volatils par la flore bactérienne ou fongique. Ces deux microorganismes aérobies et anaérobies microscopiques sont particulièrement responsables de la production des arsenicaux volatils (Liu *et al.*, 2011).

Cependant des publications antérieures ont montré que le taux d'arsenic volatilisé par les communautés microbiennes du sol a été limitée (Liu *et al.*, 2011). En outre la quantité d'arsenic volatilisée par les microorganismes était régie par de nombreux facteurs tels que les formes d'arsenic, la concentration, l'humidité du sol, la température, la matière organique, la croissance microbienne et la capacité de volatilisation de l'arsenic (Edvartoro *et al.*, 2004).

4 Mécanismes antioxydants

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au niveau des organismes ainsi que le maintien d'un stade non cytotoxique est assuré par des antioxydants (Garait, 2006).

Un antioxydant est une substance capable d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et par conséquent retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats même à concentration relativement faible (Bahi, 2015).

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes pour contrôler leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène (**figure 04**). La nature des systèmes antioxydants varie selon les tissus et les types cellulaires, aussi selon le milieu intracellulaire ou extracellulaire (Boubali, 2017).

Les antioxydants sont divisés en antioxydants non enzymatiques tels que le glutathion (GSH) et les vitamines C (ascorbate), E (tocophérol) et B6 et en antioxydants enzymatiques tels que les superoxydesdismutases, les catalases, les peroxydases et glutaredoxine (Khouja, 2011).

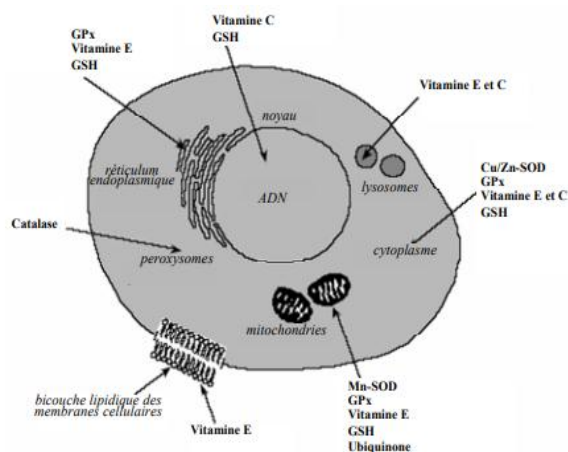


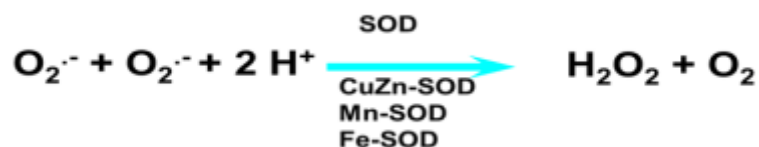
Figure 04 : répartition des principales défenses antioxydantes dans les cellules. (Mn-SOD) : superoxydedismutase mitochondriale, (Cu/Zn-SOD) : superoxydedismutase cytosolique, (GPx) : glutathion peroxydase, (GSH) : glutathion réduit (Garait, 2016).

4.1 Systèmes antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques sont considérés comme la première ligne de défense contre les différentes espèces oxydantes, leur fonction majeure est de réduire la quantité des ROS dans la cellule. Parfois, ces enzymes ont besoin d'oligo-éléments (Zn, Cu, Mn, Se, Fe.) et d'autres cofacteurs pour exercer leur activité enzymatique (Mahmoud *et al.*, 2016).

4.1.1 Superoxydedismutase (SOD)

Les superoxydedismutases (EC 1.15.1.1) sont des métallo-enzymes présentes dans l'ensemble du monde du vivant à l'exception de quelques microorganismes (Bertrand, 2008). Les superoxydedismutases peuvent éliminer l'anion superoxyde en produisant une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène selon la réaction (Mesnoua, 2016).

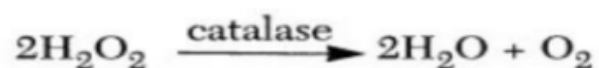


La localisation chromosomique du gène, le contenu métallique, la structure quaternaire et la localisation cellulaire des isoenzymes permettent de définir 3 types de SOD: SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) (Mahmoud *et al.*, 2016).

Au niveau de la mitochondrie, se trouvent les SOD à manganèse (SOD-Mn) alors que les SOD à zinc ou cuivre (SOD-Cu-Zn) se situent dans le cytoplasme, le noyau, le plasma ou dans la membrane des cellules endothéliales (Bahi,2015).

4.1.2 Catalase

La catalase (E.C. 1.11.1.6) est une enzyme antioxydante importante située dans les peroxysomes dont le rôle est de catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire, en association avec le SOD selon la réaction suivante : (Kebsa *et al.*, 2019).



Bien que la CAT n'est pas essentielle pour certain type de cellules dans les conditions normales, cependant elle protège les cellules du peroxyde d'hydrogène et permet l'acquisition de la tolérance du stress oxydatif lors de la réponse cellulaire adaptative (Matés *et al.*, 1999).

4.1.3 Glutathion peroxydases (GPx) :

La glutathion peroxydase (GPX) est une autre enzyme de défense pour maintenir l'équilibre cellulaire du statut redox (Dobashi *et al.*, 2001).

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme à sélénium ayant la propriété de pouvoir catalyser la réduction des hydroxyperoxydes, elle se retrouve dans les liquides extracellulaires ainsi que dans les cellules, au sein du cytosol et des mitochondries (Bouguerne, 2012).

Elle est constituée de quarts sous-unités identiques chacune contient un seul résidu séléno-cystéine (Se-Cys) identique, ce qui est essentiel pour l'activité enzymatique (Krim, 2014).

Cette enzyme constitue la principale voie de dégradation des hydroperoxydes. Cette fonction antioxydante est d'autant plus importante qu'elle joue un rôle important avec la superoxydedismutase et la vitamine E. Par conséquent, elle assurera l'équilibre intracellulaire

et extracellulaire de l'équilibre pro/antioxydant (Desmier, 2016).

La surexpression de cette enzyme a été observé pour supprimer l'apoptose réactive induite par l'oxygène dans une variété de cellules, suggérant que l'inhibition de cette enzyme est étroitement liée à la mort de la cellule apoptotique (Park *et al.*, 2003).

4.1.4 Peroxyredoxines (PRXs)

Parmi les systèmes les plus connues pour la détoxification des ROS dans les mitochondries humaines et de levure sont les glutathion (GSH) peroxydase et autres thiol-dépendants les peroxydases sont connues sous le nom de peroxyredoxines (PRXs) (Gama *et al.*, 2007).

Les peroxyredoxines (PRXs) sont des peroxydases thiol-dépendantes ubiquistes capables d'éliminer une variété de peroxydes grâce à des cystéines catalytiques réactives, qui sont régénérés par des systèmes réducteurs (Gama *et al.*, 2008).

Certaines peroxyredoxines (PRXS) sont spécialisées dans la dégradation des peroxydes organiques comme le cas de la peroxyredoxine (Ahp1) chez *Saccharomyces cerevisiae* (Shakir, 2015). Les peroxyredoxines (PRXS) avec la catalase et la glutathion peroxydase sont des enzymes importantes dans le renouvellement de H₂O₂. (Spadaro *et al.*, 2010).

4.2 Systèmes antioxydants non enzymatiques

Ce type d'antioxydants sont les oligo-éléments (Bahi, 2015). Ils ont la capacité de piéger des substances oxydées en gagnant des électrons libres, formant ainsi des substances plus stables qui peuvent être éliminées par d'autres systèmes antioxydants (Mahmoud *et al.*, 2016).

4.2.1 Glutathion(GSH)

Le glutathion se trouve dans la plupart des organismes eucaryotes et procaryotes, c'est un simple composé soufré composé de trois acides aminés et du principal thiol non protéique (Noctor *et al.*, 2011).

Le GSH est synthétisé exclusivement dans le cytosol avec un processus en plusieurs

étapes dans lequel les trois acides aminés la cystéine, le glutamate et la glycine sont combinés pour former le tripeptide GSH (Sreekumar *et al.*, 2021).

Deux molécules de GSH peuvent être liées d'une façon covalente pour former le Glutathion oxydé ou bien appelé le disulfure de glutathion (GSSG) ; le S-nitrosoglutathion, le persulfure de glutathion, le trisulfure de glutathion et les polysulfures de glutathion sont les espèces les plus connues de glutathion oxydé (Oestreicher *et al.*, 2019).

Le métabolisme du GSH se déroule généralement dans les cellules végétales et animales par le cycle γ -glutamyl (dans sa version complète, le cycle prend en compte six réactions). Mais de plusieurs recherches récentes ont démontré l'existence d'une version tronquée du cycle γ - glutamyl (Penninckx, 2002).

La majorité des fonctions du glutathion sont liées à leur rôle dans la régulation redox dans les cellules et dans la détoxification des xénobiotiques (Saster *et al.*, 2005).

Les champignons, en particulier la levure *Saccharomyces cerevisiae*, ont servis comme modèles biologiques qui ont aidé à démontrer le rôle et la fonction du glutathion dans les processus cellulaires. Par exemple, GSH est une molécule considérée comme un antioxydant non enzymatique important, qui réagit avec une série d'espèces réactives de l'oxygène (Posci *et al.*, 2004).

4.2.2 Vitamine E et Vitamine C

Les vitamines E (α -tocophérol) et C (acide ascorbique) semblent être les plus importantes pour lutter contre le stress oxydatif (Evans, 2000).

La vitamine E agit directement sur une variété de ROS, formant des radicaux libres avec une faible réactivité. Par la suite, la vitamine E oxydée peut être reconvertie principalement par la vitamine C, mais elle peut également être reconvertie par d'autres composés tels que le glutathion réduit, la vitamine A et l'ubiquinol (Kehili, 2018).

La vitamine E est liposoluble et s'est avérée être le principal antioxydant des membranes cellulaires, en particulier des mitochondries (Evans, 2000).

Également, elle peut augmenter l'activité de la SOD et de la CAT (Margaritis *et al.*, 2003). Pour certains auteurs, même si le potentiel antioxydant de la vitamine E est confirmé *in vitro*, *in vivo*, elle joue de nombreux rôles physiologiques non antioxydants dans la régulation de la fonction cellulaire. Sa faible concentration ne lui permet pas de devenir un antioxydant majeur, son utilisation à cette fin peut donc altérer la fonction cellulaire (kehili, 2018).

La vitamine C ou acide ascorbique (AA) est un antioxydant hydrosoluble qui existe sous sa forme anionique (AH^-) à pH physiologique. Elle peut réagir directement avec les ROS, notamment O_2^{\cdot} . Elle limite la peroxydation des lipides en piégeant les radicaux libres peroxydes. Elle n'est pas synthétisée par les organismes (Boudebouda *et al.*, 2013).

Cependant, selon Baroja-Mazo *et al.* (2005) les champignons semblent incapables de synthétiser normalement l'acide ascorbique, mais des espèces fongiques étudiées contiennent du D-Erythroascorbate (D EAA), un analogue de l'acide ascorbique C5. La présence de L'acide D-EAA a la place de l'acide L-ascorbique est observé chez les ascomycètes, les basidiomycètes et les zygomycètes (Khouja, 2011).

4.2.3 Proline :

La proline est un acide aminé protéinogène, considérée comme un antioxydant non enzymatique dont les champignons ont besoin pour agir contre les ROS formés lors d'un stress oxydatif métalliques (Chakraborty *et al.*, 2014).

Les acides aminés ont des sensibilités différentes à l'EOA. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire des acides aminés conduira à l'oxydation de certains résidus (Haleng, 2007).

Le dosage de la proline est considéré comme le critère de sélection pour la tolérance au stress. Elle agit comme un pénétrant pour retenir de l'eau dans le cytoplasme et prévenir le séchage membranaire et la dénaturation des protéines (Benyahmed, 2013).

La proline joue un rôle important pour réduire la toxicité du Pb(II), la proline agit comme un osmolyte, stabilisateur de protéines et de complexe macromoléculaires, piègeur de radicaux libres, régulateur de potentiel redox cellulaire (Chakraborty *et al.*, 2012).

Revue bibliographique

Mukherjee *et al.* (2010) ont démontré que l'accumulation de la proline est très significative en réponse à la toxicité d'arsenate, par *Aspergillus niger*, cela peut suggérer que la proline joue un rôle important pour piéger les ROS induits par la toxicité d'arsenate.

Matériel et méthodes

1. Introduction

Ce travail est une description d'un plan expérimental établi par Mukherjee *et al.* (2010), dont l'objectif est de définir les potentialités de biosorption et de la réponse antioxydante chez *Aspergillus niger* induite par la toxicité de l'arsenic, pour une éventuelle utilisation de cette souche pour la bioremédiation des environnements pollués par l'arsenic.

2. Matériel biologique

Cette étude porte sur la moisissure *Aspergillus niger*. Cette souche provient du laboratoire du Département de Biochimie et de Biophysique de l'Université de Kalyani

Aspergillus niger ou l'aspergille noire, est un champignon filamenteux ascomycète de l'ordre des Eurotiales. C'est l'une des espèces les plus communes du genre *Aspergillus* qui apparaît sous forme d'une moisissure de couleur noire sur les fruits et les légumes (Bennecef *et al.*, 2019). *Aspergillus niger* est capable de croître dans une large plage de température (6-47°C) avec un optimum de 35 à 37 °C (Hasnaoui *et al.*, 2020).

La croissance végétative est initiée par la germination des spores avec la formation d'un hyphes tubulaire (extension strictement apicale), donnant naissance à un réseau mycélien par ramification qui acquiert les éléments nutritifs de son environnement (Hasnaoui *et al.*, 2020).

2.1. Classification : selon (Zenati, 2018) :

Règne : Fungi

Embranchement: Ascomycota

Sous-embranchement : Deuteromycotina

Classe : Eurotiomycètes

Ordre : Eurotiales

Famille : Trichocomaceae

Genre : *Aspergillus*

Espèce : *Aspergillus niger*

2.2 Caractères cultureux d'*Aspergillus niger*

L'identification des *Aspergillus* en général se fait par la description morphologique des colonies sur gélose et des têtes aspergillaires sous microscope optique, les milieux les plus utilisés pour l'identification des *Aspergillus* sont les milieux gélosés additionnés d'extraits de malt et le milieu Czapek-Dox contenant un ou plusieurs antibiotiques (Kihel *et al.*, 2020).

Macroscopiquement, *Aspergillus niger* apparaît en colonies blanches, qui peuvent être observées à la surface de la gélose et développaient parfois des teintes jaunes sur lesquelles se forment ensuite des conidiophores noirs (**figure 05**). Avec une binoculaire, on observe des tiges fines portant de petites vésicules sphériques blanches qui se transforment en spores pigmentées noires portant de nombreuses conidies sur des phialides et des métules. Les vésicules rondes et les métules prononcées peuvent être considérées comme une caractéristique d'*A. niger* (George *et al.*, 2019).

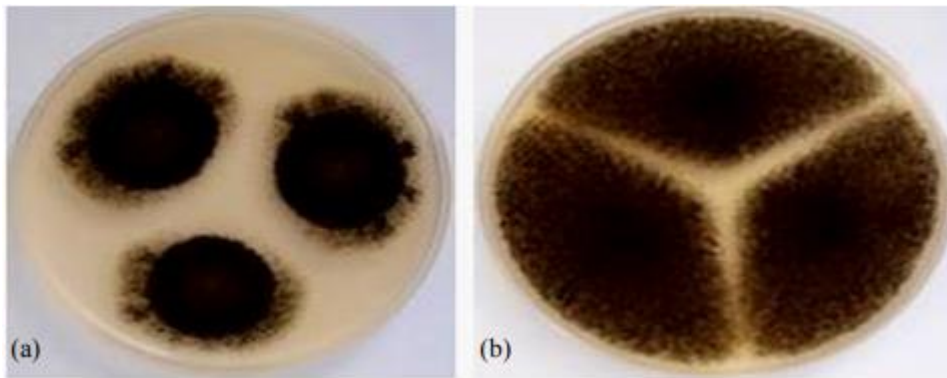


Figure 05 : *Aspergillus niger* sur milieu M2 (a) et *Aspergillus niger* sur milieu M2S5 (b) (Zenati, 2018).

La morphologie microscopique d'*A. niger* à montrer de grandes têtes conidiennes noires, globulaires, qui deviennent rayonnantes, ayant tendance à se diviser en plusieurs colonnes libres devenant sombres vers la vésicule. Les têtes conidiennes sont bisériées (disposés en deux cycles ou verticilles), avec les phialides disposées sur des métules brunes, souvent septées. Les conidies sont globulaires à sous-globulaires, noires et la paroi est rugueuse (**figure 06**). La capacité des conidies à produire des conidiophores après la germination dépend de la température et des nutriments fournis dans le milieu (George *et al.*, 2019).

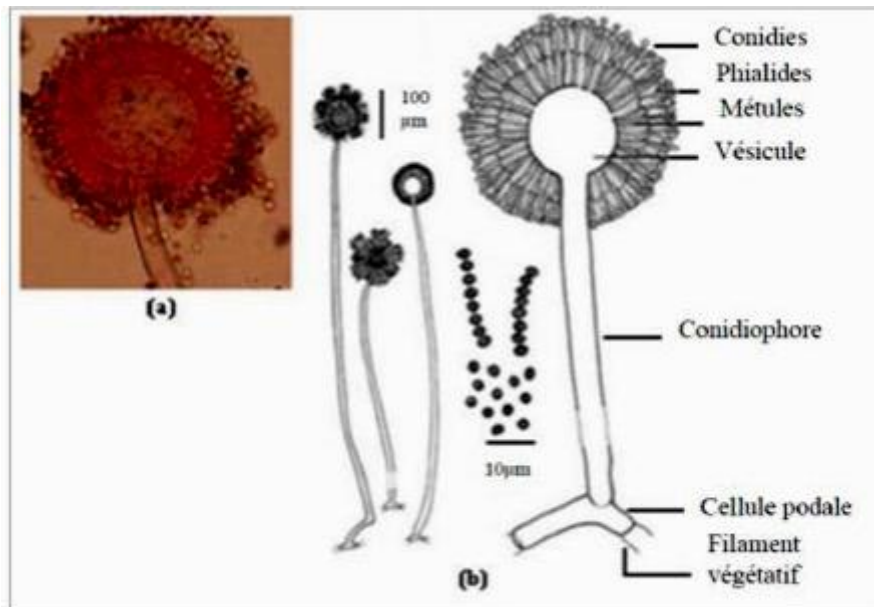


Figure 06 : aspect microscopique (a) et représentation schématique du conidiophore d'*Aspergillus niger* (b) (Pasqualotto, 2010).

3. Préparation de la biomasse fongique

La biomasse d'*A. niger* est obtenue à partir des cultures submergées en condition aérobie, sur bouillon Czapek-Dox supplémenté par des concentrations croissantes d'As (V) soit 25, 50, 75 et 100 mg/l, et le pH du milieu a été maintenu à 6,4 par l'addition appropriée d'une solution de NaOH de 0,2 M.

Au total, 100 ml du bouillon de CD contenant de l'arsenate ont été transféré dans une série d'Erlenmeyer de 500 ml ; ces milieux ont été inoculés avec des spores d'*A. niger* et incubés à 175 rpm/min à 32°C dans un agitateur orbital. Il faut savoir que la biomasse du témoin est obtenue à partir d'une culture sur bouillon CD sans l'ajout de métal dans les mêmes conditions.

La biomasse a été récoltée après une période de croissance de 96 h, filtrée et lavée à l'eau désionisée. La biomasse a été maintenue à -20°C jusqu'à son utilisation ainsi que les milieux après culture (Mukherjee *et al.*, 2010).

4. Préparation des échantillons pour l'analyse de l'arsenic

Les biomasses d'*A. niger* obtenues ont été lavées trois fois avec de l'eau déionisée afin d'éliminer les ions d'As libres, puis séchées à 45° C pendant 2 h.

Matériel et méthodes

Des étalons d'arsenic ont été préparés par dilution appropriée d'une solution mère d'arsenic à 1000 mg/l.

Pour la minéralisation (Décomposition) des échantillons : 0,2 g de la biomasse sèche d'*A. niger* et 2 ml des milieux après culture ont été acidifiés avec 5 ml d'acide sulfurique concentré puis chauffés à 160°C pendant 2 h pour obtenir un volume réduit (0,2 ml), ce volume a été ajusté à 10 ml avec de l'eau désionisée (Mukherjee *et al.*, 2010).

4.1 Analyse de l'arsenic

L'arsenic a été analysé avec un spectromètre d'absorption atomique PerkinElmer AAnalyst 200 équipé d'un système à hydrure (mercure/hydrure15) et d'un atomiseur à tube en quartz.

La pré-réduction des échantillons pour l'analyse de l'arsenic est une étape très importante pour convertir l'arsenic en forme As (III) dans la solution d'échantillon. Une aliquote de 5 ml des échantillons minéralisés et les étalons ont été transférés dans une fiole jaugée de 50 ml. Un volume de 20 ml d'eau bi-distillée, de 5 ml de HCl concentré et 2 ml de solution de KI à 20 % (p/v) ont été rajoutés. Après 15 min de réaction, 2 mL d'acide ascorbique à 10 % (p/v) ont été additionnés. Ce mélange est laissé agir pendant 1 h (Mukherjee *et al.*, 2010).

5. Dosage des biomarqueurs de toxicité

5.1 Préparation de l'extrait enzymatique

Les aliquotes enzymatiques ont été réalisés comme suit, 0,5g de la biomasse fongique (issue de la culture témoin et celle avec les différentes concentrations d'As) fraîche a été broyée dans l'azote liquide. Les protéines ont ensuite été extraites à 4 °C avec 8 ml de tampon phosphate de potassium froid (50 mM, pH 7,0) contenant 1% de polyvinylpyrrolidone (PVP) (w/v). L'homogénat a été centrifugé à 4 °C pendant 20 min et le surnageant a été utilisé pour mesurer les activités antioxydantes (Mukherjee *et al.*, 2010).

5.2 Mesure du malondialdéhyde (MDA)

La teneur en malondialdéhyde (MDA), le produit final de la peroxydation lipidique, est dosée selon la méthode de Dhindsa *et al.* (1981). Une aliquote de 0,5 ml de l'extrait est ajoutée à 1 ml de 20 % (w/v) d'acide trichloroacétique (TCA) et 0,5 % (w/v) d'acide thiobarbiturique (TBA). Le mélange est incubé à 95 °C pendant 30 minutes. La réaction est

Matériel et méthodes

arrêtée en plaçant les tubes dans un bain de glace. Une centrifugation est réalisée pendant 10 minutes, l'absorbance du surnageant est lue à 532 nm et à 600 nm. La valeur de l'absorbance non spécifique à 600 nm est soustraite de la valeur de 532 nm. La quantité du complexe MDA-TBA (pigment rouge) est calculée en utilisant l'absorbance ajustée et le coefficient d'extinction molaire $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5.3 Mesure de la superoxyde dismutase (SOD)

L'activité de la SOD a été mesurée selon la méthode de Nishikimi *et al.* (1972) avec de légères modifications. Le mélange réactionnel contenait 0,2 ml de NBT 320 mM, 0,2 ml de méthsulfatephenazine $10 \mu\text{M}$, 2 ml de tampon de pyrophosphate 0,16 M à pH 9,2 et 0,02 ml d'extrait enzymatique.

Un blanc enzymatique est obtenu avec la même quantité et l'ordre des réactifs mais en remplaçant l'enzyme par l'eau distillée. La réaction a été déclenchée simultanément dans les deux séries (blanc et réactionnelles) par l'ajout de 0,2 ml de NADH à 160 mM et les changements d'absorbance à 560 nm ont été suivis. Après 90 s, 1 ml d'acide acétique glacial a été ajouté à chaque tube réactionnel et le blanc, l'absorbance a été lue à 560 nm. Une unité d'activité SOD a été définie comme la quantité d'enzyme requise pour inhiber 50 % du taux de réduction de NBT (Mukherjee *et al.*, 2010).

5.4 Mesure de la catalase (CAT)

L'activité de la catalase a été mesurée selon la méthode de Chance et Maehly. (1955) citée par Mukherjee *et al.* (2010).

Le mélange réactionnel est préparé par addition de 0,1 ml d'extrait enzymatique et 2,9 ml de peroxyde d'hydrogène à 15 mM dans du tampon phosphate 50 mM à pH 7. La décomposition du peroxyde d'hydrogène est suivie directement en mesurant la diminution de l'absorbance à 240 nm. Les variations de l'absorbance sont lues chaque minute au cours des 3 premières minutes. Une unité d'activité de la CAT a été définie comme le changement d'absorbance de 0,01 unité par minute. L'activité spécifique de la CAT correspond à la quantité du H_2O_2 consommée par mg de protéine.

Discussion générale

Discussion générale

L'ampleur des problèmes écologiques est intimement liée au processus de développement économique et social. En effet, la pollution des sols par les métaux lourds et les métalloïdes potentiellement toxiques représente un des dangers environnementaux parmi les plus imminents et les plus importants de notre époque (Bentellis *et al.*, 2014).

En réponse aux problèmes de la contamination de l'environnement par les métaux lourds, plusieurs technologies de dépollution des sites concernés ont été développées, dont la bioremédiation, par le biais de l'utilisation de plantes ou de microorganismes (Kvamura *et al.*, 2010).

La pollution de l'environnement est un sujet d'actualité qui a fait l'objet de plusieurs investigations, d'ailleurs plusieurs travaux pertinents ont été menés dans ce contexte : Guelfi *et al.*, (2003), Chakraborty *et al.* (2012 ; 2014), Teng *et al.* (2017), Meghnous *et al.*(2019) et Kassa-Laouar *et al.* (2020).

L'objectif du présent travail est d'analyser et d'expliquer les mécanismes cellulaires et antioxydants d'*Aspergillus niger* pour la dépollution des sites pollués par l'arsenic.

En raison des difficultés rencontrées au laboratoire à cause de la pandémie de la Covid-19. Nous n'avons pas eu la chance d'appliquer notre protocole expérimental pour obtenir des résultats, mais ça n'empêche pas de juger utile notre stratégie de recherche, en se basant sur les résultats de Mukherjee *et al.* (2010).

D'après les résultats obtenus, nous constatons que l'effet toxique de l'arsenate sur le développement de la souche testée est mis en évidence par la mesure de la biomasse fongique sèche par rapport au témoin, cette toxicité se manifeste par une diminution de la croissance d'*Aspergillus niger* en fonction de l'accroissement des concentrations d'arsenate dans le milieu de culture (**figure 07**). Cette constatation peut s'expliquer par l'effet inhibiteur des éléments traces métalliques sur la croissance fongique, comme le suggère Karlinski *et al.* (2009) que les ETM diminuent la disponibilité des nutriments ce qui est similaire aux résultats obtenus pour la croissance d'*Aspergillus foetidus* en présence du plomb et du cadmium par Chakraborty *et al.*(2012 ; 2014).

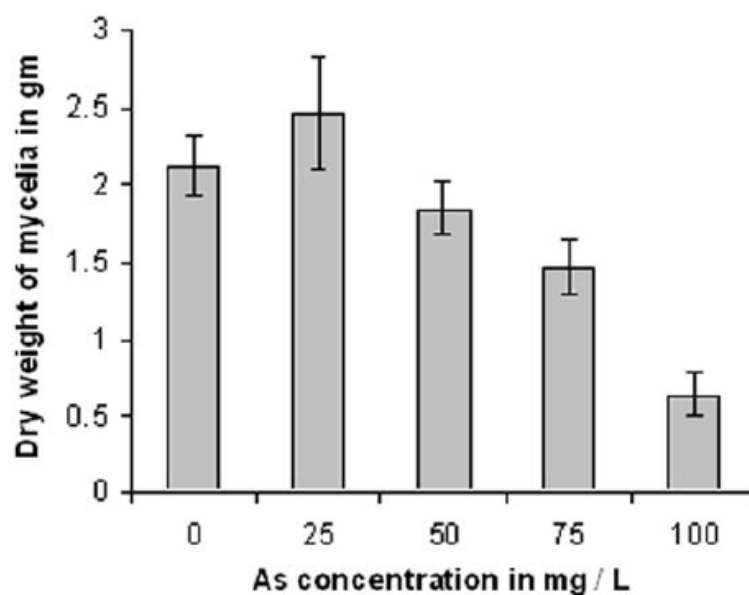


Figure 07 : poids sec de mycélium d'*A.niger* cultivé avec différentes concentrations d'arsenate.

Suivant les résultats rapportés, il semble que la croissance optimale d'*Aspergillus niger* est stimulée avec l'ajout de 25 mg/l d'arsenate (**figure 07**), nous suggérons que de faibles doses d'ions métalliques peuvent former avec les constituants du milieu de culture des substrats utiles qui permettent aux oligo-éléments essentiels de devenir disponibles pour le champignon ; à ce stade les cellules vont absorber l'arsenate avec les nutriments et vont le piéger à l'intérieure des cellules. Ce résultat est conforme avec les travaux de Meghnous *et al.* (2019) qui ont montré que la croissance d'*A.tubingensis* est stimulée à 5 mM Sb, en rapportant que la tolérance des souches fongiques varie en fonction de leur origine et des conditions environnementales dans lesquelles elles se développent, en raison d'une adaptation préalable.

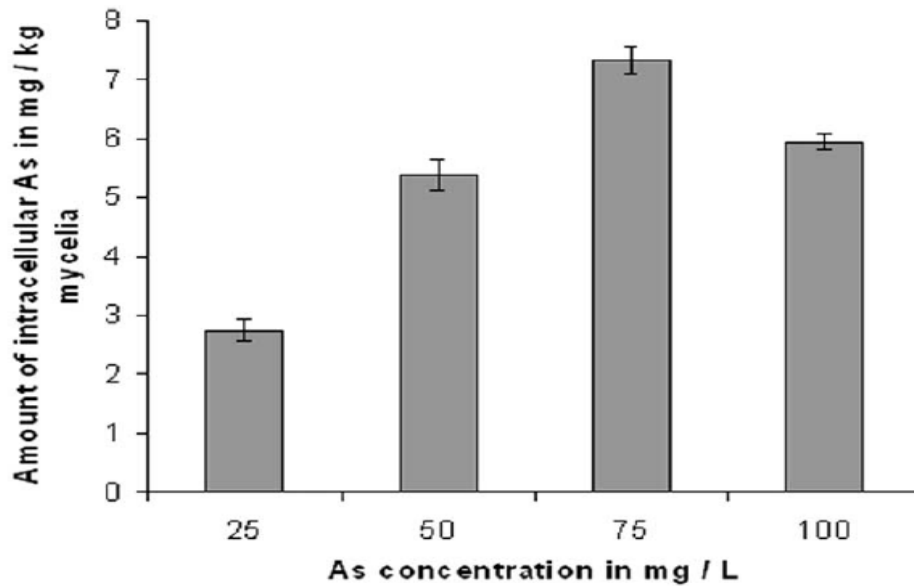


Figure 08 : l'absorption intracellulaire d'arsenate par *A.niger*.

Selon Kassa-Laouar (2020), la capacité de résistance aux métaux lourds est définie par la capacité d'un micro-organisme à réagir et à mettre en œuvre des mécanismes pour les tolérer. D'après la **figure 08**, nous remarquons que la teneur intracellulaire d'Asa augmenté progressivement avec l'accroissement des quantités d'arsenate dans le milieu avec une absorption maximale à 75mg/l ; nous suggérons que la concentration élevée d'arsenate à un effet sur la perméabilité des membranes cellulaires de la souche test.

L'accumulation intracellulaire d'arsenic chez les champignons pourrait jouer un rôle majeur dans la tolérance et la détoxification de l'arsenic (Canovas *et al.*, 2007). Des résultats similaires sont rapportés pour des souches d'*Aspergillus* et *Trichoderma* isolées à partir des sols contaminés par l'arsenic, ces souches avaient la capacité de prélever des quantités importantes d'As (Srivastava *et al.*, 2011).

Selon Bebianno *et al.* (2009), la toxicité métallique induit la libération des espèces réactives d'oxygène tel que le peroxyde d'hydrogène, qui peut être un précurseur de radicaux libre, ces ROS peuvent endommager les molécules biologiques conduisant à des effets secondaires capables d'altérer l'état physiologique du microorganisme.

En effet, la toxicité des métaux lourds affecte la morphologie, le métabolisme et la croissance des microorganismes en modifiant la structure des acides nucléiques, en perturbant les fonctions des membranes cellulaires, en inhibant les activités enzymatiques et la

Discussion générale

phosphorylation oxydative, en provoquant la peroxydation des lipides, l'altération de l'équilibre osmotique et la dénaturation des protéines (Chibuïke *et al.*, 2014 ; Xie *et al.*, 2016).

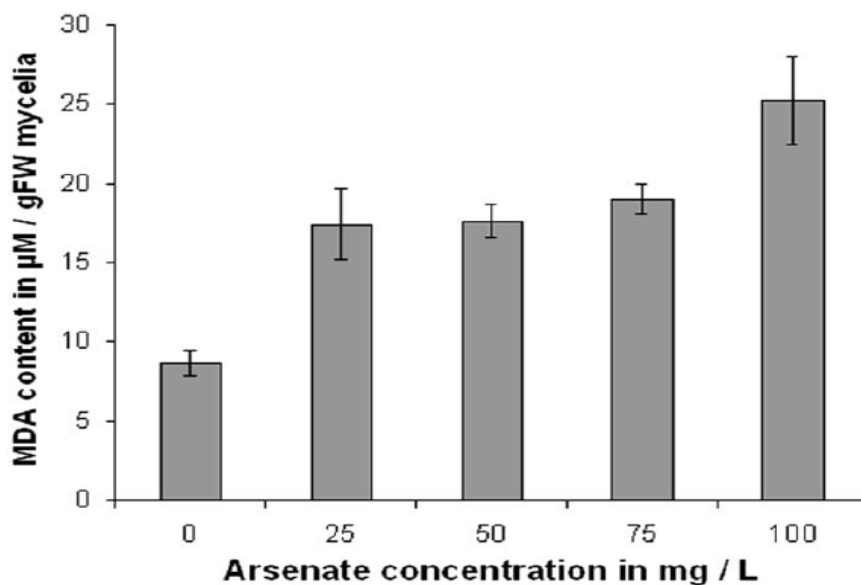


Figure 09 : contenu en MDA chez *A. niger*.

Selon la littérature scientifique, la présence des ROS dans les cellules, entraîne une peroxydation des acides gras polyinsaturés dont le produit fini est le malondialdéhyde (MDA) considéré le produit le plus mutagénique de la peroxydation lipidique. Qui est, selon Shelley (2019) un indicateur fiable de la formation des radicaux libres d'où son utilisation comme un biomarqueur de toxicité chez certains organismes vivants (Tsikas, 2017).

Les résultats obtenus montrent que la teneur en MDA a augmenté progressivement avec l'augmentation des traitements en arsenate de 25 à 100 mg/l (**figure 09**), cette augmentation peut être justifiée que les enzymes antioxydantes induites peuvent ne pas être en mesure d'éliminer complètement les ROS rapidement, ce qui conduit à une peroxydation des acides gras poly-insaturés et par conséquent des dommages membranaires de la souche test (Teng *et al.*, 2017).

Ces résultats sont conformes aux travaux de El sayed *et al.* (2020) rapportant des concentrations importantes en MDA et en H₂O₂ ont été enregistrées lors du traitement des souches de *Fusarium solani* par des concentrations croissantes d'ion Argent. D'autre part Hassan *et al.* (2020) ont montré que la production du malonodialdéhyde (MDA) se fait à

Discussion générale

l'intérieur des hyphes fongiques, et que le MDA a un effet sur la détoxification du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

La peroxydation lipidique entraîne généralement selon Shahid *et al.* (2014) une augmentation des fuites membranaires des substances qui ne traversent pas normalement les membranes, sauf *via* les canaux spécifiques, une diminution de la fluidité membranaire, ce qui facilite l'échange des phospholipides entre les deux bicouches, des dommages aux protéines membranaires qui inactivent les récepteurs, les enzymes et les canaux ioniques.

La classe principale des antioxydants enzymatiques sont les superoxydes dismutases (SOD) qui présentent la première barrière de défense antioxydante ; la SOD catalyse la conversion de $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 qui peut ensuite être converti en H_2O par la catalase et le glutathion (GSH) (Evans *et al.*, 2019).

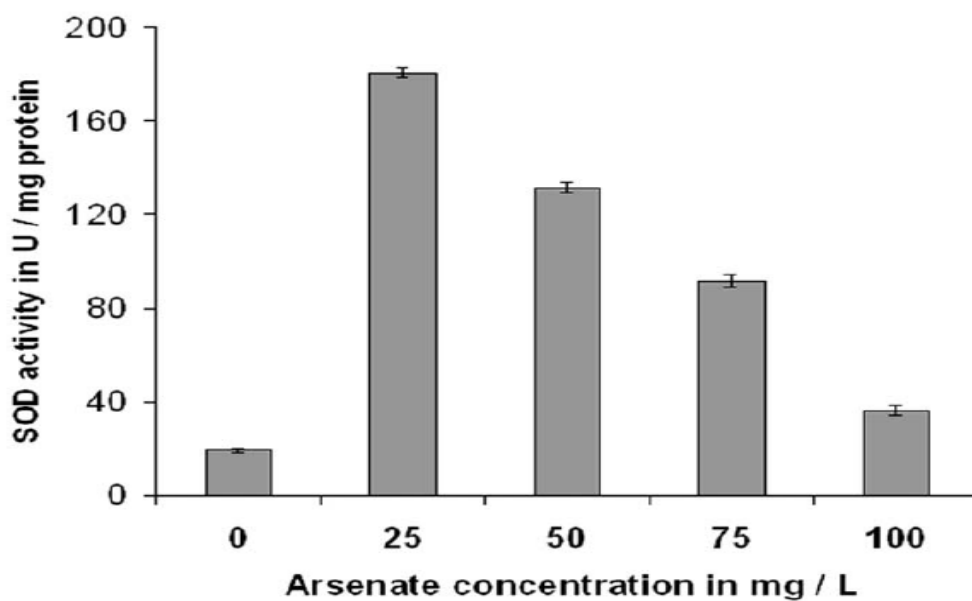


Figure 10 : activité du superoxyde dismutase (SOD) d'*A. niger*

Plusieurs auteurs rapportent que la SOD est corrélée avec les doses métalliques, or, les résultats de Mukherjee *et al.* (2010), révèlent une augmentation maximale de l'activité de la SOD à 25 mg/l. puis une diminution progressive de la SOD avec l'augmentation du stress d'As (**figure 10**), cette diminution peut être due à l'accumulation des ROS induits par les concentrations élevées d'As dans les cellules d'*A. niger*; par contre la diminution accrue de cette activité à 100mg/l peut être justifié par des troubles de la défense antioxydante dus à l'intolérance de la souche test. Des résultats similaires ont été observés chez des souches de

Discussion générale

Penicillium traitées par des concentrations croissantes en Zinc, montrant une diminution de l'activité de la SOD avec des concentrations de 54 à 72 mM en Zinc (Teng *et al.*, 2017).

De même, Hassan *et al.* (2020) ont signalé que la superoxyde dismutase (SOD) piège des espèces réactives de l'oxygène (ROS) générés par les ions de Chrome par des souches filamenteuses isolées à partir du sol ; d'autre part ils ont démontré que les indices de tolérance sont variantes d'une souche à une autre.

Au niveau cellulaire la catalase est une enzyme qui permet la dismutation du peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) H_2O_2 en $O_2 + H_2O$, au sein de la cellule, la catalase permet de protéger l'organisme de l'action oxydante néfaste du peroxyde d'hydrogène (Chakraborty *et al.*, 2012).

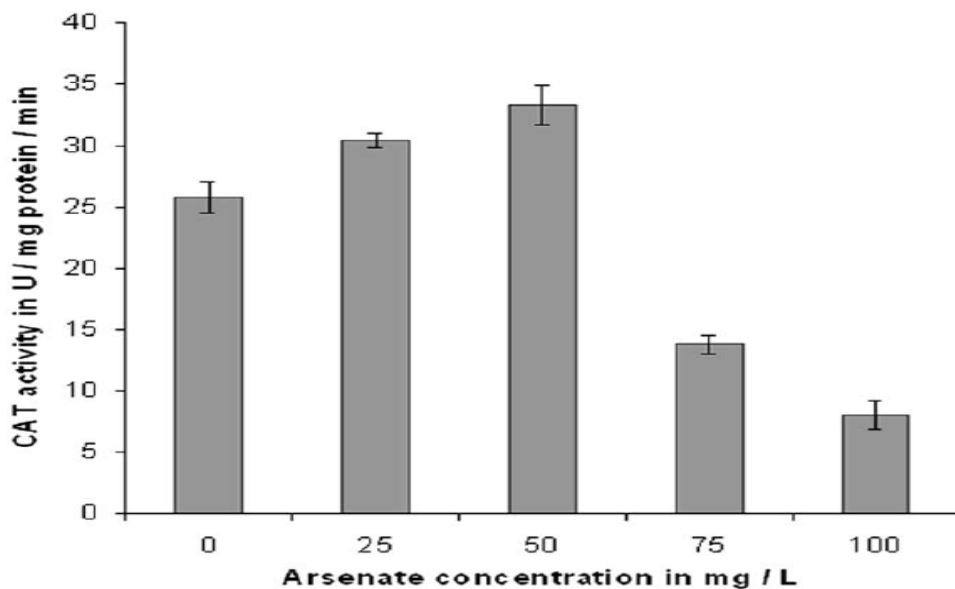


Figure 11 : activité de la catalase (CAT) d'*A. niger*

A travers les résultats fournis par Mukherjee *et al.* (2010), nous remarquons que l'effet toxique de l'arsenate a été mis en évidence par une modulation de la défense antioxydante, l'augmentation de l'activité de la CAT a été enregistrée jusqu'à 50 mg/l d'As, et au-delà de cette concentration une diminution de la CAT est observée (**figure 11**), cette dernière est provoquée par la biodisponibilité de l'arsenate et son effet altérage sur le métabolisme de

Discussion générale

l'oxygène et la production des ROS, la synthèse de ces espèces radicalaires peut être le résultat de la métabolisme intracellulaire de la souche test (Su *et al.*, 2011).

Ces résultats vont vers le même sens que ceux enregistrés chez *Aspergillus foetidus* par Chakraborty *et al.* (2014) qui ont noté une augmentation de l'activité de CAT en fonction de différentes concentrations en Cadmium avec une activité maximale à 5 mM Cd.

Plusieurs antioxydants tels que la CAT sont impliqués pour l'élimination des ROS, en minimisant l'impact du stress oxydatif chez *Aspergillus flavus* CR500 ; cette enzyme antioxydante confère à ce champignon de tolérer 1200, 1600 et 2000 mg/l de Pb, Ni et As respectivement (Kumar *et al.*, 2020).

La diminution de l'activité de la catalase observée à 75 et 100 mg/l (**figure 11**), signifie que cette activité enzymatique peut être désactivée ou bien inhibée par le stress oxydant de très forte intensité.

Des résultats similaires montrant que la CAT est un antioxydant très sensible, ceci est rapporté par une diminution de l'activité CAT de *Penicillium sp* lorsque la concentration en zinc était de 5 mM (Teng *et al.*, 2017), aussi une diminution de l'activité CAT avec une augmentation supplémentaire de doses de Cd a été observé chez *Aspergillus foetidus* (Chakraborty *et al.*, 2014).

Selon Abrashev *et al.* (2008) la SOD et la CAT sont considérés comme des enzymes de piégeage, qui servent de première ligne de défense contre le stress oxydatif en empêchant l'accumulation de ROS.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

La pollution des sols par les métaux lourds en particulier par l'arsenic présente un risque majeur pour tous les organismes vivants dans le sol, notamment les microorganismes. Notre travail porte essentiellement sur l'élimination biologique de l'arsenic par *Aspergillus niger*.

Les expérimentations réalisées au cours de cette étude portent sur :

- L'impact de l'arsenic sur la croissance d'*Aspergillus niger* et son pouvoir cellulaire d'élimination d'As.
- L'effet toxique d'arsenic sur l'activité de la catalase, l'activité de la superoxyde dismutase et sur l'indicateur du niveau de stress oxydant (MDA).

D'après les résultats nous concluons :

- La toxicité d'arsenic se traduit par une diminution du taux de croissance d'*Aspergillus niger* avec l'augmentation des doses d'As dans le milieu de culture
- *A. niger* a montré une capacité d'accumulation d'As dans sa biomasse avec une accumulation maximale à 75 mg /L As.
- L'évaluation du potentiel antioxydant d'*A. niger* a mis en évidence que les niveaux élevés en As dans le milieu, induisent une génération de ROS, ce qui stimule la synthèse des biomarqueurs antioxydants pour lutter contre ces ROS.

En perspective, il serait intéressant de :

- Connaître l'impact d'autres métaux lourds sur cette souche afin de déterminer son éventuelle aptitude à dépolluer les sols pollués par ces mêmes métaux.
- Étudier la réponse antioxydante par la mesure d'autres biomarqueurs, notamment le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde.
- Compléter ce travail par l'étude moléculaire des gènes de résistance.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Abdelly, C (2006). Bioremédiation/ Phytoremédiation. Thèse De Doctorat: Science Nature Tunisie: Université De Tunisie, 232p.
- Abrashev, R., Pashova, S., Stefanova, Ln., Vassilev, S., Dolashka-Angelova, P., Angelova, M (2008). Heat-Shock-Induced Oxidative Stress And Antioxidant Response In *Aspergillus Niger* 26. *Can J Microbiol.* 54(12), 83p.
- Ademe, A (2006). Traitement Biologique Des Sols Pollués: Recherche Et Innovation. Coordination Technique. Rapport De Recherche : Département Sites Et Sols Pollués – Direction: France, 92p.
- Adjali, S (2019). Micromycètes De La Région De Biskra: Agents Causaux Des Mycoses Animales: Cas De Foughala Et Elkantra. Mémoire Master Recherche: Production Et Nutrition Animale: Université Mohamed Khider De Biskra, 58p.
- Adjia, H (2012). Adsorption Des Métaux Lourds Des Eaux Usées Par Les Argiles Alluviales De L'extrême-Nord Cameroun. Thèse De Doctorat: Géosciences/Chimie Industrielle Et Environnement. France: Université De Lorraine, 247p.
- Adriano, D (2001). Trace Elements In Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability And Risks Of Metals, 2nd Edition, 867p.
- Akhtar, A., Mannan, M (2020). Mycoremediation : Expunging Environmental Pollutants. (26), 452p.
- Akhtar, N., Mannan, M (2020). Mycoremediation: Expunging Environmental Pollutants(en ligne), 26.Disponible sur : https://www.researchgate.net/publication/340549890_Mycoremediation_Expunging_Environmental_Pollutants (Page Consultée Le 15/08/2021)
- Ali Seid, M., Anil, K., Reeta, G (2011). Heavy Metal Pollution Impact, And Remedies.Sourcebiomanagement Of Metal-Contaminated Soils, Environmental Pollution, 1-28p.
- Alvarez, D., Ruiz, N., Torres, C (2011). Characterization Of Mercury Bioremediation By Transgenic Bacteria Expressing Metallothionein And Polyphosphate Kinase.11 (82), 491-496p.
- Anahid, S., Yaghmaei, S., Ghobadinejad, Z (2011). Heavy Metal Tolerance Of Fungi. *Scientia Iranica*,18(3), 502-505p.

Références bibliographiques

- Anger, J., Labat, L., Lhermitte, M (2005). La Biométhylation Des Métaux Chez L'homme Et Dans L'environnement: Succés Ou Echech Sur Le Plan Toxicologique. 17 (3), 175-185p.
- Atoui, A (2006). Approche De La Mycotoxinogenese Chez *Aspergillus Ochraceus* Et *Aspergillus Carbonarius*: Etudesmoleculaire Et Physiologique. Thèse De Doctorat Rechercher: Microbiologie Et Biocatalyse Industrielles: Institut National Polytechnique De Toulouse, 199p.

B

- Bahi, A (2015). L'effet Protecteur Des Antioxydants Naturels Dans L'intoxication Du Mercure Chez Le Rat Albinos Wistar (Aspects Biochimiques, Immunologiques Et Histologiques). These De Doctorat: Biochimie Appliquée.Constantine: Université Des Frères Mentouri –Constantine, 127p.
- Baize, D., Tercé, M (2002). Les Eléments Traces Métalliques Dans Les Sols. Approches fonctionnelles Et Spatiales, 570p.
- Baldrian, P (2003). Interactions of Heavy Metals With White-Rot Fungi. 32(1), 78-91p.
- Bayou, R., Laieb, H., Mokhbi, A (2012). Bioaccumulation Des Métaux Lourds Par Les Bactéries. Mémoire: Microbiologie.Jijel: Université De Jijel, 50p.
- Bebianno, M., Oleveira, M., Maria,V., Ahmad, I., Serafim, A., Pacheco, M., Santos, M (2009).Contamination Assessment Of A Coastal Lagoon (Ria De Aveiro, Portugal) Using Defence And Damage Biochemical Indicators In Gill Of *Liza Aurata* – An Integrated Biomarker Approach.157, 959-967p.
- Belouchrani, A., Abdi, N., Lounici, H., Mameri, N., Mouhpiche, B (2013). Contributoin A L'aide De L'effet Des Micro-Organismes Dans La Bioremediation D'un Sol Pollué Par Le Zin, 53p.
- Belouchrani, M., Hemmouch, L., Chicot, D., Amrouche, A., Lost, A (2013). An Analysis Of The Elastic Properties Of A Porous Aluminium Oxide Film By Means Of Indentation Techniques.585, 155-164p.
- Benabdallah, I., Kouadra, H (2014). Impact Du Plomb Ou Du Cadmium Sur La Croissance Et Sur Quelques Systèmes De Détoxification D'une Souche D'*aspergillus Sp.* Mémoire Master Recherche: Biotechnologie Des Mycètes, Fermentation Et Production De Substances Fongiques: Constantine: Université Constantine, 79p.

Références bibliographiques

- Benavides, M., Gallego, S., Tomaro, M (2005). Cadmium Toxicity In Plants. Brazilian Journal Of Plant Physiology, 17(1), 21–34p.
- Benhamdi , A (2014). Etude Des Enzymes De Stress Oxydatif Chez Hedysarum Pallidum Desf. Et Lygeumspartum L. En Réponse A La Pollution Du Sol Par L'antimoine. These De Doctorat: Biochimie Et Biotechnologie. Constantine: Université Constantine 1, 104p.
- Bennecif, L., Ouali, Z (2019). Evaluation De L'activité De L'huile Essentielle Deschinus Molle Vis-A-Vis D'*aspergillus Niger*, Moisissure Du Blé De Stockage Non Traité. Memoire: Microbiologie Appliqué: Université Mohamed El Bachir El Ibrahimy - B.B.A, 29p.
- Bennet, J., Wunch, K., Faison, B (2002). Use Of Fungi Biodegradation, 960-971p.
- Bentellis, A., Azzoug, R., Hadeff El Okki, M., Rached, O (2014). Trace Elements Pollution From An Abandoned Mine And Factors Affecting Antimony Concentrations In The Dahiminewadi Bank Soils (Northeast Algeria). 9, 95–106p.
- Benyahmed, J (2013). Etude Des Propriétés De Tolérance Au Déficit Hydrique Et Au Stress Salin De Géotypes Appartenant Au Genre Poncirus Et Au Groupe Des Mandariniers, 200 p.
- Biteur, N (2012). Essais D'utilisation Du Radis (*Raphanussativus*) Dans La Phytoremédiation (Biodépollution) Au Niveau Du Sol Contaminé Par Les Métaux Lourds (Plomb) : Etude Du Stress Oxydatif Et Quelques Paramètres Enzymatiques. These De Doctorat: Biochimie Appliquée: Université D'es-Seniaoran-Oran, 110p.
- Boubali, Z (2017). Biomarqueurs Du Stress Oxydatif. These De Doctorat. Université Mohamed V-Rabat, 118p.
- Boudebouda, K (2013). Contribution A La Détermination Des Biomarqueurs De Stress Oxydant Chez Les Lichens. Mémoire: Toxicologie De L'environnement. Jijel: Université De Jijel, 61p.
- Bouguerne, B (2012). Conception Et Synthèse De Direve phenolyque et hotement fonncionalisées Et Etude De Leurs Propriétés Biologique Vis-A-Vis Des Maladie Cardiovasculaires(Athérosclérose). Thèse De Doctorat: Biochimie: Université De Toulouse, 198p.
- Boulanger, H (2005). Pertinence De La Mise En Place D'une Etude D'imprégnation A L'arsenic D'origine Tellurique De La Population Lorraine. Mémoire Master Recherche:Ingénieur Du Génie Sanitaire.Ecole Nationale De La Sante Publique, 43p.

Références bibliographiques

- Bounab, A., Khenchil, S (2015). Application Des Biomarqueurs Du Stress Oxydant A L'évaluation De L'exposition Environnementale Des Nouveaux-Nés Aux Métaux Lourds: Cas Des Villes De Jijel Et Taher. Mémoire De Recherche: Toxicologie De L'environnement. Jijel: Université Med-Seddikbenyahia-Jijel, 67p.
- Bourdier, A., Aujoulat, F., Roger, F., Lotthé, A., Lamy, B (2005). From Environment To Man: Genome Evolution And Adaptation Of Human Opportunistic Bacterial Pathogens. 3 (2), 191-232p.
- Boutamine, S., Boumelta, R (2019). Impact Des Décharges Sauvages Sur Les Sols Et Les Méthodes De Remédiation. Master Académique : Toxicologie Fondamentale Et Appliquée. Université Med-Seddikbenyahia-Jijel, 42p.

C

- Canovas, C., Nieto, J., Sarmiento, A., Olias, M., Riba, I., Kalman, J., Delvalls, A (2007). Acid Mine Drainage Pollution In The Tinto And Odiel Rivers (Iberian Pyrite Belt, Sw Spain) And Bioavailability Of The Transported Metals To The Huelva Estuary. 33, 445-455p.
- Caporale, A., Violante, A (2015). Chemical Processes Affecting The Mobility Of Heavy Metals And Metalloids In Soil Environments. Current Pollution Reports, 2(1), 15–27p.
- Cardiere, F (2006). Traitement Biologique Des Sols Pollués: Recherche Et Innovation. Ademe (Angers), 86p.
- Casas, S (2005). Modelisation De La Bioaccumulation De Metaux Traces (Hg, Cd, Pb, Cu Et Zn) Chez La Moule, *MytilusGalloprovincialis*, En Milieu Mediterranéen. Thèse De Doctorat: Océanologie Biologique, Environnement Marin. Université De Sud, 314p.
- Chakraborty, S., Mukhrejee, A., Daskumar, T (2012). Biochemical Characterization Of A Lead-Tolerant Strain Of *Aspergillus foetidus*: An Implication Of Bioremediation Of Lead From Liquid Media, 1-9p.
- Chakraborty, S., Mukhrejee, A., Kumar Das, T., Khuda-Bukhs, A (2014). Cadmium-Induced Oxidative Stress Tolerance In Cadmium Resistant *Aspergillus foetidus*: Its Possible Role In Cadmium Bioremediation. 106, 46-53p.
- Chance, B., Maehly, A (1955). Assay Of Catalases And Peroxidases. Methods In Enzymology, Academic Press. 2, 764–775p.

Références bibliographiques

- Charissou, A., Bispo, A., Devillers, J., Pandar, D (2009). Biodisponibilité Et Bioaccessibilité Des Polluants Dans Le Cas Des Sols Pollués Etat Des Connaissances Et Pistes De Recherche.(10), 10-671p.
- Chen, M., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., Zhang, J (2015). Bioremediation Of Soils Contaminated With Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Petroleum, Pesticides, Chlorophenols And Heavy Metals By Composting: Applications, Microbes And Future Research Needs. 33(01), 745-755p.
- Cherfaoui, M (2015). Modeling, Simulation And Performance Analysis Of A Flexible Production System. 5, 26-49p.
- Chibueze, A., Blaise, C., Chijioke, O (2016). Bioremédiation tecniques- Classification Based On Site Of Application: Principles, Advantages, Limitation And Prospects, 32,180p.
- Chibuike, G (2014). Heavy Metal Polluted Soils: Effect On Plants and Bioremediation Methods. Appl Environ Soilsci, 1–12p.
- Colombano, S., Saada, A., Guerin, V (2010). Quelles Techniques Pour Quels Traitements - Analyse Coûts-Bénéfices - Rapport Final Brgm-Rp-58609-Fr, 378-480p.
- Comperdon, B (2014). Mécanismes Et Transferts De L'arsenic Dans Une Confluence Du Var Et Etude D'une Méthode De Remédiation Dans Les Eaux Potables. Thèse De Doctorat : Sciences De L'environnement: Universite De Nice Sophia Antipolis, 198p
- Croteau, D., Bohr, Wilhelm, A (1997). Repair Of Oxidative Damage To Nuclear And Mitochondrial Dna In Mammalian Cells. The Journal Of Biological Chemistry, 272 (10), 25409–25412p
- Crous, P., Verkley, G., Groenewald, J., Samson, A (2009). Fungal Biodiversty, 269p.

D

- Da Silva, S., De Almeida, F., Da Rocha, N., Casazza, A., Converti, A., Sarubbo, L (2020). Soil Bioremediation: Overview Of Technologies And Trends. Energies, 13(18), 25p.
- Deneux-Mustin, S., Roussel-Debet, S., Mustin, C., Henner, P., Munier-Lamy, C., Colle, C., Berthelin, J., Garnier-Laplace, J., Leyval, C (2003). Mobilité Et Transfert Racinaire Des Eléments En Traces: Influence Des Micro-Organismes Du Sol. Paris: Lavoisier,45-135p.

Références bibliographiques

- Deschamps, T., Benzaazoua, M., Bussière, B., Belem, T., Mbonimpa, T (2006). Mécanismes De Réthention Des Métaux Lourds En Phase Solide: Cas De La Stabilisation Des Sols Contaminés Et Des Déchets Industriels, 2171p.
- Desmier, T (2016). Les Antioxydants De Nos Jours: Definition Et Applications. Thèse De Doctorat :Biochimie: Université De Limoges, 88p.
- Desoubeaux, G., Chandrenier, J (2010). Diagnostic Biologique D'une Infection Aspergillaire. 11(294), 129p.
- Dhindsa, R., Plumb-Dhindsa, P., Thorpe, T (1981). Leafsenescence: Correlatedwith Increased Levels Of Membrane Permeability And Lipid Peroxidation, Anddecreased Levels Of Superoxide Dismutase And Catalase.32, 93–101p.
- Dobashi, K., Aihara, M., Araki, T., Utsugi, M (2001). Regulation Of Lps Induced Il-12 Production By Ifn- Γ And Il-4 Through Intracellular Glutathione Status In Human Alveolar Macrophages, 87p (Page Consultée le 15/08/21021)
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2249.2001.01535.x>
- Dzschamps, T., Benzaazoua, M., Bussière, B., Belem, T., Mbonimpa, M (2006). Mécanismes De Réthention Des Métaux Lourds En Phase Solide: Case De La Stabilisation Des Sols Contaminés Et Des Déchets Industriels.7(2), 53p.

E

- Eccles, H (1995). Removal Of Heavy Metals From Effluent Streams: Why Select Biological Preocess. 35, 5-16p.
- Edvantoro, B., Naidu, R., Megharaj, M., Merrington, G., Singleton, I (2004). Microbial Formation Of Volatile Arsenic In Cattle Dip Site Soils Contaminated With Arsenic And Ddt. Applied Soil Ecology, 25(3), 207–217p.
- El-Sayed, A., El-Sayed, M (2020). Tolerance And Mycoremediation Of Silver Ions By *Fusarium Solani*.6, 655–661p.
- Evans, W (2000). Vitamin E, Vitamin C, And Exercise. The American Journal Of Clinical Nutrition, 72(2), 647–652p.
- Evans, F., Bardos, P., Boyle, R., Howard, T (2019). Sustainability Assessment Framework And Indicators Developed By Surf-Uk For Land Remediation Option Appraisal, 4-27p.

Références bibliographiques

F

- Ferry, L., Bouzou, N (2019). Sagesse Et Folie Du Monde Qui Vient - Comment S'y Préparer, Comment Y Préparer Nos Enfants. Edition1, 437p.
- Floch, N., Burgard, M., Blanche, S., Jasseron, C., Descamps, P., Ciraru-Vigneron, C., Heller-Roussin, B., Lachassinée Mazy, F., Warszawski, J., Rouzioux, C (1996). Performance Of Hiv-1 Dna Or Hiv-1 Rna Tests For Early Diagnosis Of Perinatal Hiv-1 Infection During Anti-Retroviral Prophylaxis. *J Pediatr*, 160 (1), 60-66p.
- Fomina, M., Alexander, I., Colpaert, J., Gadd, G (2005). Solubilization Of Toxic Metal Minerals And Metal Tolerance Of Mycorrhizal Fungi. *Soil Biology And Biochemistry*, 37(5), 851–866p.
- Fritsch, D., Budd, P., Mckeown, N (2008). Gas Permeation Parameters And Other Physicochemical Properties Of A Polymer Of Intrinsic Microporosity: Polybenzodioxane Pim-1, 851-860p.

G

- Geoffrey, M (2004). Microbial Influence On Metal Mobility And Application For Bioremediation. *Geoderma*, 122(24), 109-119p.
- Gadd, G (1993). Microbial Formation And Transformation Of Organometallic And Organometalloid Compounds. 11, 297-316p.
- Gama, C., Kunz, M., Andrezza, C., Salvador, M (2008). Elevated Serum Superoxide Dismutase And Thiobarbituric Acid Reactive Substances In Different Phases Of Bipolar Disorder And In Schizophrenia. 32 (7), 1677-1681p.
- Gama, J., Gaber, M (2007). Use Of Plant Materials For The Bioremediation Of Soil From An Industrial Site. 55 (6), 1-11p.
- Garait, B (2006). Le Stress Oxydant Induit Par Voie Métabolique (Régimes Alimentaires) Ou Par Voie Gazeuse (Hyperoxie) Et Effet De La Glisodin. Thèse De Doctorat : Biologie Cellulaire .France: Université De Toulouse, 189p.
- Garait, B., Schéma Des Différentes Formes De Ros (2006) [Shéma]. Le Stress Oxydant Induit Par Voie Métabolique (Régimes Alimentaires) Ou Par Voie Gazeuse (Hyperoxie) Et Effet De La Glisodin.
- Geoffrey, M (2008). Etude De Bioremediation De Sédiments Contaminés Par Des Composés Organiques Nitres Persistants. Thèse De Doctorat: Institut National Polytechnique De Toulouse: Université De Toulouse, 200p.

Références bibliographiques

- George, M., Ramteke, P (2019). Morphology, Molecular Identification And phylogenetic analysis based On Internal transcribed spacer (Its) Of The Ribosomal Nucleardna (Rdna) Sequence Of Apathogenic fungal isolate *Aspergillus niger* Lko1. The JournalofThe Society For Tropical Plant Research, 6(2), 166-170p.
- Gharieb, M., Kierans, M., Gadd, G (1999). Transformation And Tolerance Of Tellurite By Filamentous Fungi: Accumulation, Reduction, And Volatilization. Mycological Research, 103(3), 299–305p.
- Giasson, P., Jouich, A., Gange, S., Moutoglis, P (2005). Phytoremediation Of Zinc And Cadmium: A Study Of Arbuscularmycorrhizal Hyphae. 15(4), 113-122p.
- Guelfi, A., Azevedo, A., Lea, P., Molina, S (2003). Growth Inhibition Of The Filalmentous Fungus *Aspergillus nidulans* By Cadimium: An Antioxidant Enzyme Approach.49, 63-73p.

H

- Habi, S (2009). Etude De La Métallo-Résistance Et De L'halo-Tolérance Des Entérobactéries Isolées Des Eaux De Surface De La Région De Setif. These De Doctorat D'état: Seiences De La Nature Et De La Vie: Universitéferhat Abbas Sétif, 280p.
- Haleng, J., Pincemail, J., Vanbelle, S., Gaspard, U., Colette, G (2007). Effect Of Different Contraceptive Methods On The Oxidative Stress Status In Women Aged 40–48 Years From The Elan Study In The Province Of Liege, Belgium. 22, 2335-2343p.
- Hammadache, Z., Guerrache, S., Saib, S (2016). Evaluation Du Transfert Des Métaux Lourds Dans Le Système Sol-Plante (Phragmites Austrlis) Dans Le Bassin Versant D'oued Nil La Région De Jijel. Mémoire Master DE Recherche: Ecologie, Biodiversité, Evolution Et Conservation. Boumerdes: Universite M'hamed Bougara Boumerdes, 56p.
- Hasnaoui, S., Zemmouri, S., Ziadi, Ch (2020). La Production Des Enzymes Pectinolytiques Par *Aspergillus niger* Cultivé Sur Les Résidus D'agrumes. Mémoire Master De Recherche: Mycologie Et Biotechnologie Fongique. Constantine: Université Des Frères Mentouri Constantine, 45p.
- Hassan, A., Pariatamby, A., Ossai, I., Hamid, F (2020). Bioaugmentation Assisted Mycoremediation Of Heavy Metal And/Metalloid Landfill Contaminated Soil Using Consortia Of Filamentous Fungi. 157, 107-550p.
- Hocking, D (2009). *Aspergillus*And Related Teleomorphs.17, 2-8p.

Références bibliographiques

- Henault-Either, L (2016). Image.Laphytoremediation.Institut National De La Recherche Scientifique | Inrs · Eau Terre Environnement Centre, 22p.
- Hubau, A., Minier, M., Chagnes, A (2020). Recovery Of Metals In A Double-Stage Continuous Bioreactor For Acidic Bioleaching Of Printed Circuit Boards (Pcbs), Separation And Purification Technology, 238p.
- Huynh, T (2009). Impacts Des Métaux Lourds Sur L'interaction Plante/ Ver De Terre/ Microflore Tellurique. Mémoire Master De Recherche : Ecologie Microbienne. Paris: Université Paris Est, 145p.

J

- Jakob, R., Roth, A., Haas, K., Krupp, E., Raab, A., Smichowski, P., Feldmann, J (2010). Atmospheric Stability Of Arsines And The Determination Of Their Oxidative Products In Atmospheric Aerosols (Pm10): Evidence Of The Widespread Phenomena Of Biovolatilization Of Arsenic. J. Environ. Monit, 12(2), 409–416p.

K

- Kabata-Pendias, A (1995). Agricultural Problems Related To Excessive Trace Metal Contents Of Soils. Heavy Metals, 1-18p
- Karlinski, L., Rudwaska, M., Rokicka, B., Leski, T (2009). Relationship Between Genotype And Soil Environment During Colonization Of Poplar Roots By Mycorrhizal And Endophytic Fungi. 20(5), 315-24p.
- Kassa-Laouar, M., Mechakra, A., Rodrigue, A., Meghnous, O., Bentellis, A., And Rached, O (2020). Antioxidative Enzyme Responses To Antimony Stress Of *Serratiamarcescens* – An Endophytic Bacteria Of *Hedysarumpallidum* Roots. Polish Journal Of Environmental Studies. 29(1), 141-152p.
- Kavamura, V (2010). Biotechnological Strategies Applied To The Decontamination Of Soils Polluted With Heavy Metals. Biotechnol Adv. 28, 61-69p.
- Kebir, T (2012). Etude De Contamination, D'accumulation Et De Mobilité De Quelques Métaux Lourds Dans Des Légumes, Des Fruits Et Des Sols Agricoles Situes Pres D'une Décharge Industrielle De L'usine Alzinc De La Ville De Ghazaouet. Thèse De Doctorat: Chimie De L'environnement. Tlemcen: Université Abou BekrBelkaid -Tlemcen, 53p.

Références bibliographiques

- Kebsa, I., Moherm, M (2020). Effets Du Stress De L'aluminium (Al³⁺) Sur La Germination Et Quelques Marqueurs Physiologique Et Biochimique Des Plantules De Blé Dur. Mémoire: Toxicologie.El Oued: Université D'el Oued, 63p.
- Kehili, N (2018). L'effet Protecteur D'un Antioxydant Naturel Contre Le Stress Oxydatif Induit Par Le Chlorure De Cadmium. Thèse De Doctorat: Biologie Animale Et Environnementale. Annaba: Université Badji-Mokhtar-Annaba, 153p.
- Kerfaoui, M (2015). Bioremediation Of Polluted Waters Using Microorganisms.10, 607-70p.
- Khan, F., Rahman, U., Jan, A., Riaz, M (2004). "Toxic Andtrace Metals (Pb, Cd, Zn, Cu, Mn, Ni, Co And Cr) In Dust,Dustfall/Soil" Journal Of The Chemical Society Of Pakistan.26(4), 453–456p.
- Khouja, H (2011). Identification Par Approches Moléculaires De Gènes Impliqués Dans La Tolérance Au Stress Oxydatif Chez Le Champignon Mycorhizien idiodendronmaius. Thèse De Doctorat: Science De La Vie: Universit À Deglistudi Di Torino, 152p.
- Khozani, M., Emtiazi, G., Aghaei, S., Ghasemi, S., Zolfaghari, M (2020). Application Of Fungal Laccase For Heavy Metals Precipitation Using Tannin As A Natural Mediator. 18, 2335-2344p.
- Kihel, A., Ramdhane, A (2020). La Polygalacturonase D'*Aspergillus niger* : Production, Séparation Et Application Industrielle. Mémoire: Biochimie De La Nutrition. Constantine: Université Des Frères Mentouri Constantine 1, 57 p.
- Krasny, L., Bird, G., Zhang, Y., Tian, Y (2016). The Mechanism Of Rna 5' Capping With Nad⁺, Nadh And Desphospho-Coa. 535 (7612), 444-447p.
- Krika, A (2014). Etude De La Distribution Des Métaux Lourds Dans Les Ripisylves De L'oued Rhumel. Mémoire : Pollution Et Ecotoxicologie. Constantine: Université Constantine 1, 184p.
- Krim, M (2014). L'importance Des Antioxydants (Gingembre) Dans La Réduction Des Effets Toxiques Induits Par Les Chromates Chez Les Rats. These De Doctorat: Chimie: Universite BadjiMokhtar – Annaba, 145p.
- Kumar, M., Patel, A., Singh, A (2020). Mitigating The Risk Of Arsenic And Fluoride Contamination Of Groundwater Through A Multi-Model Framework Of Statistical Assessment And Natural Remediation Techniques, 285-300p.

L

Références bibliographiques

- Lecllier, A (2013). Détection, Caractérisation Et Identification Des Moisissures Par Spectroscopie Vibrationnelle Infrarouge Et Raman. Thèse De Doctorat: Biologie-Biophysique. Université De Reims Champagne-Ardenne Ecole Doctorale Sciences Technologie Sante, 160p.
- Li, Y., Chen, B., He, M., Hu, B (2018). Bimethylation Metabolism Study Of Arsénite In Scc-7 Cells By Reversed Phase Ion Pair High Performance Liquide Chromatography Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.188, 210-217p.
- Liphadzi, M., Kirkham, M., Musil, C (2016). Phytoremediation Of Soil Contaminated With Heavy Metals: A Technology For Trhabilitation Of The Environment. South African Journal Of Botany. 71(1), 24-37p.
- Liphadzi, M., Kirkham, M., Musil, C (2005). Phytoremediation Of Soil Contaminated With Heavy Metals: A Technology For Rehabilitation Of The Environment. 71 (1), 24-37p.
- Liu, S., Zhang, F., Chen, J., Guoxin (2011). Arsenic Removal From Contaminated Soil Via Biovolatilization By Genetically Engineered Bacteria Under Laboratory Conditions. Journal Of Environmental Sciences.23 (9), 1544–1550p.

M

- Maheswari, S., Murugesan, A (2009). Remediation Of Arsenic In Soil By *Aspergillus nidulans* isolated From An Arsenic-Contaminated Site 30(9), 921-926p.
- Mahmoud, A., Fenghour, M (2016). Etude De L'effet Protecteur D'un Produit De La Ruche, La Gelée Royale Sur Le Stress Oxydatif Et L'inflammation Induit Par Le Formaldéhyde Chez Le Rat.Memoire: Immunologie Moléculaire Et Cellulaire: Oncologie.Constantine: Université Des Frères Mentouri Constantine, 63p.
- Maillard, E (2014).Transport And Degradation Of Pesticides In Wetland systems: Adown scaling approach. Thèse De Doctorat: Géochimie De L'environnement. France: Université De Strasbourg, 230p.
- Malayeri, B (1995). Décontamination Des Sols Contenant Des Métaux Lourds A L'aide De Plantes Et De Microorganismes. Thèse De Doctorat: Biologie Des Organismes. Franc : Université Henri Poincaré, Nancy 1, 99 P.
- Mandal, B., Suzuki, K., Kazoo, T (2002). Arsenic Round The World: A Review. (58), 201 – 235p.

Références bibliographiques

- Mani, D., Kumar, C (2014). Biotechnological Advances In Bioremediation Of Heavy Metals Contaminated Ecosystems: An Overview With Special Reference To Phytoremediation. 11, 843-872p.
- Manlius, N., Battaglia-Brunet, F., Michel, C (2009). Pollution Des Eaux Par L'arsenic Et Acceptabilité Des Procédés De Biotraitement, 173p
- Margaritis, I., Palazzetti, S., Rousseau, A., Richard, M., Favier, A (2003). Antioxidant Supplementation And Tapering Exercise Improve Exercise-Induced Antioxidant Response. Journal Of The American College Of Nutrition. 22(2), 147–156p.
- Marian, V., Dieter, L., Jan, M., Mark, T., Milan, M., Joshua, T (2007). Free Radicals And Antioxidants In Normal Physiological Functions And Human Disease. The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology.39, 44-84p.
- Marnett, T., Lawrence, J (1999). Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesi. Lipid Peroxidation—Dna Damage By Malondialdehyde.424 (12), 83-95p
- Matés, J., Pérez-Gómez, C., De Castro, I (1999). Antioxidant Enzymes And Human Diseases. Clinical Biochemistry, 32, 595–603p.
- Math, K., Hamzah, N (2016). Improving Mathematical Model In Biodegradation Of Pahs Contaminated Soil Using Gram-Positive Bacteria, 443-458p.
- Mccutcheon, S., Schnoor, L (2003). Phytoremediation : Transformation And Control Of Contaminants. Environmental Science And Technology: A Wiley-Interscience Series Of Texts And Monographs Series. 118, 970- 988p.
- Meghnous, O (2020). Etude De L'aptitude Des Souches Fongiques, Isolées Dela Rhizosphère De Deux Plantes Steppiques De Larégion Minière D'ain-Babouche, A La Remédiationdes Sols Métallifères. Thèse De Doctorat: Biotechnologie Et Bioprocédés, Applications Mycologiques. Lieu De Soutenance: Université Des Frères Mentouri Constantine1, 126p.
- Mekricha, S., Shuka, P (2019). Alternative Strategies For Microbial Remediation Of Pollutants Via Synthetic Biology. 11, 808p.
- Mesnoua, M (2016). Srezss Abiotiques Sur Atriplexhalimus L: Effet Des Métaux Lourds Et Caractérisation Des Biomarqueurs Et Bionidicateurs. Thèse De Doctorat: Biologie Végétale : Université Abdelhamid Ben Badis-Mostaganem, 122p.
- Messai, K (2014). Etude De La Pollution Maritime Par Les Métaix Lourds (Pb,Zn) Dans La Cote De Jijel. Mémoire: Pollution Des Ecosystèmes Et Ecotoxicologie. Constantine: Université Constantine 1, 53 p.

Références bibliographiques

- Michel, C., Chardin, B., Bruschi, M (2000). Bioremediation Des Métaux Lourds Par Les Bactéries Sulfato-Réductrices, 17, 34-37p.
- Michel, J., Zengel, S., Rutherford, N., Bernik, B., Nixon, Z (2000). Salt Marsh Remediation And The Deepwater Horizon Oil Spill, The Role Of Planting In Vegetation And Macroinvertebrate Recovery, 1985-1999p.
- Møller, I., Jensen, P., Hansson, A (2007). Oxidative Modifications To Cellular Components In Plants. Annual review Of Plant Biology. 58(1), 459–481p.
- Morin, N., Janssen, P., Houdt, R (2010). The Complete Genome Sequence Of *Cupriavidus metallidurans* Strain Ch34, A Master Survivalist In Harsh And Anthropogenic. Disponible Sur: 973978p. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0010433>
- Mueller, M., Schmit, J (2007). An Estimate Of The Lower Limit Of Global Fungal Diversity. 16(1), 99-111p.
- Mukhrajee, A., Das, D., Mondal, K., Biswas, R., Kumar Das, T., Boujedaini, N., Khuda-Bukhsh, A (2010). Tolerance of arsenate-Induced stress in *aspergillus niger*, A possible candidate for Bioremediation. 73, 172-182p.
- Muller, M., Schmit, J (2007). An Estimate Of The Lower Limit Of Global Fungal Diversity. 16(1), 99-111p.

N

- Nguemte, P (2019). Phytoremédiation Des Sols Pollués Par Les Hydrocarbures: Inventaires Floristiques, Evaluation Des Performances Des Espèces Végétales Et Modélisation Du Transfert Sol-Plante Des Hap. These De Doctorat. Biotechnologies Végétales – Phytoremédiation, 281p.
- Niedernhofer, L., Daniels, J., Rouzer, C., Greene, R., Marnett, L (2003). Malondialdehyde, A Product Of Lipid Peroxidation, Is Mutagenic In Human Cells. J Biol Chem, 15(33), 33p.
- Nilanjana, D., Vimala, R., Karthika, P (2008). Biosorption Of Heavy metals -An Overview. Indian Journal Of Biotechnology. 7, 159-169p.
- Nishikimi, M., Appaji, N., Yagi, K (1972). The Occurrence Of Superoxide Anion In The Reaction Of Reduced Phenazinemetosulfate And Molecular Oxygen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 849–854p.
- Noctor, G., Foyer, C (2011). Ascorbate And Glutathione: The Heart Of The Redox Hub. 155 (1), 2-18p.

Références bibliographiques

- Nouri, L., Maghr, J (2016). Les Techniques De Dépollution Des Sols Contaminés Par Les Métaux Lourds: The Remediation Techniques Of Heavy metals contaminated soils.2(2), 47-58p.

O

- Oestreicher, U., Hladik, D., Hoig, I., Beckers, J (2019). Long-Term Culture Of Mesenchymal Stem Cells Impairs Atm-Dependent Recognition Of Dna Breaks And Increases Genetic Instability. 10 (1), 1-12p.
- Otmani, H (2018). Evaluation De La Toxicité De Quelques Métaux Lourds Sur Le Comportement D'un Modèle Animal Du Groupe Des Coelomates. Thèse De Doctorat: Biologie/Toxicologie. Annaba : Université Badji Mokhtar, 90p.
- Ouattara, A (2008). Lixiviation Fongique Des Résidus Miniers Par A. *Niger* Et P. *Simplicissimum*. Thèse De Doctorat: En Génie Civil. Université Laval Québec,296p.

P

- Park, Y., Miamoto, Y., Koh, H., Fujiwara, N., Misonou, Y (2003). Oxidative Stress Caused By Inactivation Of Glutathione Peroxidase And Adaptive Responses,567-74p.
- Pasqualotto, C (2010). Aspergillosis: From diagnosis To Prevention. Ed Springer science And Business Media. New York, 1027p.
- Pathak, A., Dastidar, M., Sreekrishnan, T (2019). Bioleaching Of Heavy Metals From Sewage Sludge, 2343-2353p.
- Pathak, M., Bhatt, P., Bagheri, R., Bilal, M (2019). Microplastic Contaminants In The Aqueous Environment, Fate, Toxicity Consequences, And Remediation Strategies. 200, 111-762p.
- Peltier, C., Un Cristal D'arsenic Retrouvé Dans Des Mines Japonaises. (2010) (Photo). In: <https://www.futura-sciences.com/sante/actualites/medecine-leucemie-arsenic-24452/>
- Penninckx, M (2002). An Overview On Glutathione In *Saccharomyces* Versus Non-Conventional Yeasts. 2 (3), 295-305p.
- Perchet, G (2008). Etude De Bioremédiation De Sédiments Contaminés Par Des Composés Organiques Nitrés Persistants. Thèse De Doctorat. Sciences Des Agroressources. Institut National Polytechnique De Toulouse, 260p.

Références bibliographiques

- Picard, F (2015). Traitement Des Sols Contaminés Aux Hydrocarbures C10-C50 Et Aux Métaux Lourds Cu Pb Zn. Thèse De Doctorat: Ecole polytechnique De Montréal:Université De Montréal, 87p.
- Pier-Anne, B (2009). Etude De L'effet De La Contamination En Métaux Lourds Sur Frankiaspp. Et Sa Symbiose Avec L'aulne Noir (*Alnusglutinosa* (L.) Gaertn). Thèse De Doctorat: Biochemie: Université De Sherbrooke, 83p.
- Posci, I., Taylor, S., Richardson, A., Smith, B., Price, R (2004). Comparison Of Several New Chromogenic galactosides As Substrates For Various β -D-Galactosidases. *Biochimbiophys Acta*1163, 54–60p.
- Pourrut, B (2008). Implication Du Stress Oxydatif Dans La Toxicité Du Plomb Sur Une Plante Modèle, *Vicia Faba*. Thèse De Doctorat: Ecotoxicologie: Université De Toulouse, 284p.
- Pramila. R., Ramesh, K., Krishnan, M (2012). *Brevi bacillus parabrevis*, *Acinetobacter baumannii* And *Pseudomonas Citronellolis* - Potential Candidates For Biodegradation Of Low Density Polyethylene (Ldpe). 4(1), 9-14p.
- Proust, N., Guéry, J., Picot, A (2000). Toxicologie De L'arsenic Et De Ses Composés: Importance, 21p.

R

- Redcker, D (2002). Molecular Identification And Phylogeny Of Arbuscular mycorrhizal Fungi. 244(1), 67-73p.
- Remon, E (2006). Tolérance Et Accumulation Des Métaux Lourds Par La Végétation Spontanée Des Friches Métallurgiques: Vers De Nouvelles Méthodes De Bio-Dépollution. Thèse De Doctorat. Université Jean Monnet, 166p.
- Repelini, F (2000). La Phytoremédiation Des Sols Pollués Par Les Métaux. Rapport De Recherche Bibliographique: Ecophysiologie Végétale. Université Sciences Et Techniques De Saint-Etienne, 21p.
- Roger, P., Jaq, V (2000). Introduction A La Bioremédiation Des Sols, Des Eaux Et De L'air. Thèse De Doctorat: Laboratoire De Microbiologie Ird Institut De Recherche Pour Le Développement Ird, 99p.

Références bibliographiques

- Romdhane, M (2011). Immobilisation Des Bactéries Isolées A Partir Des Zones Minières Sur Des Supports Polymériques Pour La Bioremédiation. Mémoire De Master Recherche : Centre Nationale Des Sciences Et Technologie Nucléaires: Université De La Manouba. Tunisie, 33p.
- Rose, Pk., Devi, R (2018). Heavy Metal Tolerance And Adaptability Assessment Of Indigenous Filamentous Fungi Isolated From Industrial Wastewater And Sludge Samples. Beni-Suefunivjbasic App Sci. 7, 688–694p.
- Roy, P., Vaseashta, M., Vakilovicova, S., Gallios, G (2007). Nanostructures In Environmental Pollution Detection, Monitoring, And Remediation, 8- 47p.
- Remon, E (2008). Tolérance Et Accumulation Des Métaux Lourds Par La Végétation Spontanée Des Friches Métallurgiques: Vers De Nouvelles Méthodes De Bio-Dépollution. Thèse De Doctorat.Université Jean Monnet, 152p.

S

- Samson, B., Asia, H., Stéphan, H., Homma, K (2009). Biochar Amendment Techniques For Upland Rice Production In Northern Laos: 1. Soil Physical Properties, Leaf Spad And Grain Yield. 111 (12), 81-84p.
- Saster, M., Shukla, R., Bandal, V., Chaudhary, M., Basu, A (2005). Biocompatibility Of Gold Nanoparticles And Their Endocytotic Fate Inside The Cellular Compartment: A Microscopic Overview. 21 (23), 10644-10654p.
- Sayed, K., Baloo, L., Sharma, N (2021). Biotransformation Of Total Petroleum Hydrocarbons (Tph) By Bioaugmentation And Biostimulation In Water With Floating Oil Spill Containment Booms As Bioreactor Basin. 18(5), 2226p.
- Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M., Pinellie (2014). Heavy-Metal-Induced Reactive Oxygen Species: Phytotoxicity And Physicochemical Changes In Plants. In: Whitacre D. (Eds) Reviews Of Environmental Contamination And Toxicology. Reviews Of Environmental Contamination And Toxicology (Continuation Of Residue Reviews), 232p.
- Shakir, A (2015). Molecular Characterization And Serological Cut-Off (Copro-Antigen Elisa) Of Entamoebahistoltytica And Giardia Lamblia-Khartoum State. Sudan University Of Science And Technology College Of Graduate Studies, 146p.
- Shamim. Biosorption Of Heavy Metals [En Ligne]. (Page Consultée Le 01/07/2021). <https://www.intechopen.com/books/biosorption/biosorption-of-heavy-metals>

Références bibliographiques

- Sharma, I (2012). Arsenic Induced Oxidative Stress In Plants. *Biologia*.3, 67p.
- Sharma, B., Thakur, S., Mamba, G., Gupta, R., Gupta, G., Thakur, K (2021). Titania Modified Gum Tragacanth Based Hydrogel Nanocomposite For Water Remediation. *9*(1), 235-256p.
- Shelley, F (2019). Peroxydation De Lipide (Page Consultée Le 01/07/2021). [https://www.news-medical.net/Life-Sciences/Lipid-Peroxydation-\(French\).aspx](https://www.news-medical.net/Life-Sciences/Lipid-Peroxydation-(French).aspx).
- Singh, J., Kour, D., Kaur, T (2021). Beneficial Microbiomes For Bioremediation Of Diverse Contaminated Environments For Environmental Sustainability: Present Status And Future Challenges. *28*, 24–39p.
- Spadaro, A., Antonella, M., Asner, D (2010). Flavor Physics In The Quark Sector. *494*, 197-414p.
- Sreekumar, S., Deng, X., Khalid, M (2012). Transmission, Infectivity, And Neutralization Of A Spike L452r Sars-Cov-2 Variant. *184*, 326-437p.
- Srivastava, S., Abhilash, P., Singh, N (2001). Comparative Bioremediation Potential Of Four Rhizospheric Microbial Species Against Lindane. *82*, 56-63p.
- St-Germain, D (2021). Saint-Germain: Initiez-Vous A La Cueillette aux champignons. (Page Consultée Le 12/07/2021). https://www.cheminsrencontres.com/activites/autres/mycologie/index_mycologie.php
- Su, S., Zeng, X., Bai, L., Li, L., Duan, R (2011). Arsenic Biotransformation By Arsenic-Resistant Fungi *Trichoderma asperellum* Sm-12f1, *Penicillium janthinellum* Sm-12f4, And *Fusarium oxysporum* Cz-8f1, 5057–5062p.
- Sylvie, E (2003). Mise En Evidence Et Suivi De L'oxydation Des Lipides Au Cours De La Conservation Et De La Transformation Du Chinchard (*Trachurus trachurus*): Choix Des Procédés. Mémoire : Biochimie. Université De Nantes, 143p.

T

- Taofeek, A., Tolulope, O (2012). Evaluation Of Some Heavy Metals In Soils Along A Major Road In Ogbomoso, South West Nigeria. *Of Environment and Earth science*, *2*.(8), 27p
- Taylor, L., Larsen, T., Leigh, M., Brien, D (2009). Stable Isotope Fingerprinting: A Novel Method For Identifying Plant, Fungal, Or Bacterial Origins Of Amino Acids. *90* (12), 3526-3535p.

Références bibliographiques

- Teng, Y., Wang, B., Wang, Q., Liu, W., Liu, X (2017). Biosurfactant-Producing Microorganism *Pseudomonas* Sp. Sb Assists The Phytoremediation Of Ddt-Contaminated Soil By Two Grass Species. 182, 137-142p.
- Tsikas, D (2017). Assessment Of Lipid Peroxidation By Measuring Malondialdehyde (Mda) And Relatives In Biological Samples: Analytical And Biological Challenges. *Anal Biochem.* 524, 13–30p.
- Turner, J., Piacenza, E., Lampis, S (2018). Microbial-Based Bioremediation Of Selenium And Tellurim Compounds, 56-90p.

V

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., Telser, J (2007). Free Radicals And Antioxidants In Normal Physiological Functions And Human Disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84p.
- Verdin, A., Lounes, A., Durand, R (2004). Les Agents De La Bioremédiation Des Sols Pollués Par Les Hydrocarbures Polycycliques Aromatiques. 4(36), 30-37p.
- Vincent, C (2004). Caractérisation De La Mobilisation Potentielle De L'arsenic Et D'autres Constituants Inorganiques Présents Dans Les Sols Issus D'un Site Minier Aurifère. Thèse De Doctorat: Sciences Et Techniques Du Déchet. Lyon: Ecole Doctorale De Chimie De Lyon (Chimie, Procédés, Environnement), 187p.

W

- White, C., Wilkinson, S., Geoffrey, M (1995). The Role Of Microorganisms In Biosorption Of Toxic Metals And Radionuclides. 35, 17-40p.
- Wu, Y., Xia, L., Yu, Z., Shabbir, S., Kerr, G (2011). In Situ Bioremediation Of Surface Waters By Periphytons, 367-372p.

X

- Xie, Y., Fan, J., Amombo, E., Lou, Y., Chen, L (2016). Effect Of Heavy Metals Pollution On Soil Microbial Diversity And Bermuda grass Genetic Variation. *Front Plant Sci.* 31(7), 775p.

Références bibliographiques

Y

- Yadav, A (2012). Beneficial Plant-Microbe Interactions For Agricultural Sustainability. 9 (1), 1-4p.
- Yang, J., Wang, Q., Wang, Q., Wu, T (2009). Heavy Metals Extraction From Municipal Solid Waste Incineration Fly Ash Using Adapted Metal Tolerant *Aspergillus niger*. Bioresource Technology, 100(1), 254–260p.
- Ye, J., Rensing, C., Rosen, P., Zhu, Y (2011). Arsenic Biomethylation by Photosynthetic Organisms. 17, 155-162p.

Z

- Zawierucha, I., Mlaina, G (2011). Bioremediation Of Contaminated Soils: Effects Of Bioaugmentation And Biostimulation On Enhancing Biodegradation Of Oil Hydrocarbons.108, 187-201p.
- Zenati, R (2018). Fermentation D'*Aspergillus niger* Cultivé Sur Milieu A Base Delactosérum. Mémoire Master: Microbiologie Appliquée. Oum El Bouaghi: Universitél'arbi Ben Mhidi, 66 p.
- Zeng, X., Wei, S., Sun, L., Jacques, D., Tang, J., Lian, M., Z., Zhu, J., Xu, Z (2015). Bioleaching of Heavy Metals from Contaminated Sediments by the *Aspergillus niger* Strain Sy1. 8, 72-78p.
- Zhang, J., Peng, W., Wang, L (2018) Lenup: Learning Nucleosome Positioning From Dna Sequences With Improved Convolutional Neural. Networks Bioinformatics. 34(10), 705-712p.

Annexes



Tolerance of arsenate-induced stress in *Aspergillus niger*, a possible candidate for bioremediation

Abhishek Mukherjee^a, Durba Das^b, Sushil Kumar Mondal^b, Raktim Biswas^b, Tapan Kumar Das^a, Naoual Boujedaini^c, Anisur R. Khuda-Bukhsh^{b,*}

^a Department of Biochemistry and Biophysics, University of Kalyani, Kalyani 741235, India

^b Cytogenetics and Molecular Biology Laboratory, Department of Zoology, University of Kalyani, Kalyani 741235, India

^c Boiron Lab, Sainte-Foy-Les-Lyon 69110, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 January 2009

Received in revised form

28 May 2009

Accepted 13 September 2009

Available online 6 October 2009

Keywords:

Arsenate

Aspergillus niger

Thiols

Oxidative stress

Lipid peroxidation

Toxicity biomarkers

Bioremediation

ABSTRACT

The arsenate tolerance limit in wild-type *Aspergillus niger* was determined. Because of its high tolerance, toxic effects of arsenate concentrations ranging from 25 to 100 mg/L were investigated in regard to growth, intracellular thiols, proline and malondialdehyde (MDA) contents of wild-type *A. niger*. Cellular arsenate uptake was analyzed. Activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR) and succinate dehydrogenase (SDH) were assayed. Growth of *A. niger* increased at 25 mg/L arsenate, and it survived up to 100 mg/L. MDA, intracellular thiol and proline contents increased up to a certain level. Activities of GR, SOD and CAT declined following a rise at low concentration(s); SDH activity decreased gradually with increased arsenate stress. Results indicated that *A. niger* had high arsenate uptake potential and could tolerate oxidative stress by manipulating its anti-oxidative defense mechanism, a property that may be exploited for removal of arsenate from contaminated aqua-environment.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The toxicity of heavy metals to microorganisms has attracted considerable research attention in recent years, particularly in view of geogenic mobilization of some toxic metals in the aquifers resulting in drinking water contamination in many countries. Of these, arsenic contamination has become a serious problem. Arsenic (As) is a toxic metalloid widely distributed in the environment with arsenate and arsenite being predominant inorganic forms (Cai et al., 2009; Ordonez et al., 2005). The presence of arsenic in soil and groundwater is a major health concern in many countries like India, Bangladesh, Thailand, Argentina, Nepal, Poland, etc. (Chakraborti et al., 2003; Mandal et al., 1997; Dhar et al., 1997; Mukherjee et al., 2006). Physical elimination of arsenic from soil and aquatic environments is an impractical proposition because of: (i) high cost for large-scale burial of wastes and (ii) lack of suitable remediation methods (Knudson et al., 2003). However, an alternative form of bioremediation has been attempted with microorganisms like fungi, some

of which showed promising results, being low-cost adsorbants for heavy metals (Kapoor and Viraraghavan, 1995).

The use of microorganisms in bioleaching of metals has been extensively studied (Torma, 1988). *Aspergillus niger*, the fungus species under current report, has also been found to be very efficient in bioleaching of several heavy metals (Aung and Ting, 2005; Santhiya and Ting, 2005, 2006) and some hyper-tolerant strains of *Aspergillus* sp. have been reported (Canovas et al., 2004). *A. niger* B strain, isolated from arsenic-free soil, was found to volatilize arsenic from liquid medium up to a significant extent (Urik et al., 2007). *A. niger* strain, isolated from soil of leather tanning effluent, has been found to remove chromium very effectively from liquid medium as well as from soil microcosm with different concentrations of chromate (Srivastava and Thakur, 2006). Bioremediation process was developed using *A. niger* to produce a variety of organic acids for the leaching of heavy metals from contaminated soils (Wasay et al., 1998; Ren et al., 2009). Some studies have already been undertaken to understand the mechanism(s) by which arsenate, the main chemical form of arsenic encountered under aerobic conditions can get entry into the cells of the fungus (Rosen, 1999).

Mechanisms of arsenic toxicity and its natural responses in living systems are of growing interest today and the aim of which is to see how arsenate toxicity is counterbalanced by living systems. One plausible mechanism that is known to be adopted

* Corresponding author. Fax: +91 33 25828282.

E-mail addresses: prof_arkb@yahoo.co.in, khudabukhsh_48@rediffmail.com (A.R. Khuda-Bukhsh).

for detoxification or hypertolerance is by conjugation with thiol species as is often found in plants. Arsenic can be chelated by GSH and phytochelatins through thiolate bonds (Gailer and Lindner, 1998; Schmoeger et al., 2000). *Saccharomyces cerevisiae* tolerates a certain level of arsenic exposure by the sequestration of As(GS)₃ in vacuoles (Ghosh et al., 1999). GSH overproduction has been reported in *Arabidopsis thaliana* that can bring about a moderately higher arsenic tolerance in this species (Dhankher et al., 2002). Phytochelatins (PC) are induced in plants by several heavy metals including arsenic (Rauser, 1995) and used to counteract the toxic effects of heavy metals (Cobbett, 2000). *Pteris vittata* has been shown to possess a phytochelatin-dependent mechanism to be mainly involved in As tolerance, and phytochelatin-dependent detoxification seemed to be a supplement (Zhang et al., 2004). Canovas et al. (2004) showed that soluble thiol species, in particular GSH, play key role in orchestrating the response of *Aspergillus* species P37 to either low or high concentrations of arsenic. Thiol–arsenic complexes were formed and stored in vacuoles of *Aspergillus* species P37 (Canovas et al., 2004).

Arsenic is known to increase oxidative stress in cells (Chou et al., 2004). Enzymatic as well as non-enzymatic antioxidant mechanisms are increased by arsenic leading to its detoxification in hyper-accumulator species (Srivastava et al., 2005; Singh et al., 2005). In contrast, As-induced oxidative stress in non-hyperaccumulators causes cellular damage by enhancing lipid peroxidation, H₂O₂ accumulation and up-regulates several scavenging enzymes (Hartley-Whitaker et al., 2001; Mascher et al., 2002). Mylona et al. (1998) showed that arsenic in low concentrations increased the activity of catalase and superoxide dismutase in maize embryos, the modulation being at the transcriptional level. Higher activity of oxidative enzymes in correspondence with arsenic accumulation was observed in *P. vittata* (Srivastava et al., 2005). In *P. vittata*, enzymatic antioxidants like SOD, catalase and peroxidases were reported to increase in response to increasing arsenic in soil (Cao et al., 2003).

Arsenic has been shown to induce severe lipid peroxidation in bean (Stoeva et al., 2005), *Pteris* species (Srivastava et al., 2005; Singh et al., 2005), mung bean roots (Singh et al., 2007) and rice seedlings (Shri et al., 2008). Lipid peroxidation and SOD activities were found to be correlated with increasing arsenate concentration in *Holcus lanatus* L. (Hartley-Whitaker et al., 2001). Increase in MDA level indicates membrane damage due to peroxidation of poly-unsaturated fatty acids resulting in ROS generation and oxidative stress (Montillet et al., 2005).

Todorova et al. (2008) showed cadmium (II) stress-induced reactive oxygen species generation in *A. niger* B77 and tolerance of the strain being highly correlated to the efficiency of its anti-oxidative defense system.

Thus, any living organism that can withstand high concentrations of arsenic and has intrinsic mechanism to tolerate the toxicity or oxidative stress originating from the exposure may be a suitable candidate for bioremediation. However, admittedly, along with these the suitability of a species in bioremediation processes would further depend on many other factors, like bioaccumulation and biotransformation capability, facility to find and manipulate organisms, possibility to operate both in field and laboratory condition, possibility to test wide battery of biological, biochemical and chemical parameters, capability of the organisms to adapt to adverse conditions, etc.

Production of proline is one of the mechanisms by which many plants and algae reduce heavy metal toxicity (Delauney and Verma, 1993; Schat et al., 1997; Shah and Dubey, 1998; Mehta and Gaur, 1999; Verma, 1999). Proline accumulation in stressed plant causes reduced damage to membranes and proteins (Alia et al., 1997; Shah and Dubey, 1998; Verma, 1999). Up-regulation of proline is often found in several plants and other organisms under

heavy metal stress (Alia and Saradhi, 1991; Wu et al., 1995, 1998) and may point to the occurrence of a scavenging mechanism as a metal chelator (Farago and Mullen, 1979). However, several mechanisms have been proposed for proline-mediated reduction of heavy metal stress. Free proline may act as an osmoprotectant (Paleg et al., 1984; Delauney and Verma, 1993; Taylor, 1996) and a protein stabilizer (Kuznetsov and Shevyakova, 1997; Shah and Dubey, 1998). Proline may reduce the hazardous effects of ROS generation by acting as an inhibitor of lipid peroxidation (Mehta and Gaur, 1999), a hydroxyl radical scavenger (Smirnov and Cumbes, 1989) and a singlet oxygen scavenger (Alia et al., 2001).

Responses of several plants and fungi to arsenic have been extensively studied but much less work was done on effect of arsenic toxicity on *Aspergillus* species. Several microorganisms, including *Aspergillus*, have been shown to remove toxic metals from solution (Kapoor and Viraraghavan, 1997; Kapoor et al., 1999). To select a particular species for bioremediation of toxic metals, it is very important to identify the effects of those metals on that particular species and cellular responses elicited by that species to counteract such toxic environment and thus understanding mechanisms involved in tolerance or detoxification of toxic metal stress.

Experiments on bio-volatilization of arsenic have been carried out with *Penicillium* sp. strain with 10 mg/L arsenic in liquid growth medium (Vosoottiviset and Panviraj, 2001). *Scopulariopsis brevicaulis* could bio-volatilize arsenic from culture media having 5–300 mg/L arsenic (Pearce et al., 1998). *Aspergillus* species and several other microorganisms have been shown to grow in liquid medium with 20 mg/L arsenate (Urik et al., 2007). Therefore, there exist some naturally occurring species of microorganisms, which can tolerate much higher concentrations of arsenic, and *Aspergillus* is one among them (Canovas et al., 2003; Buckova et al., 2005, 2007).

Therefore, this study was undertaken primarily to examine the arsenate tolerance limit of *A. niger* wild-type and arsenate biosorption capacity of the strain; further, the responses evoked to counter arsenate toxicity by suitable alterations of certain enzymes and several biomolecules were analyzed to understand the possible cellular strategy towards tolerance of arsenate-induced toxicity and thereby to evaluate the possibility of application of the test strain for bioremediation of arsenic from arsenic-contaminated aqua-environment.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism and culture media

Wild-type *A. niger* strain was kept and cultured in CD medium that contained (per liter): NaNO₃ (2.0 g), MgSO₄ (0.5 g), KCl (0.5 g), FeSO₄ (0.01 g), ZnSO₄ (0.01 g), glucose (40.0 g). KH₂PO₄ was used as phosphate source. The pH of the medium was adjusted to 6.4 with 0.2 M NaOH solution before autoclaving. The medium was solidified with 2% agar as solid CD medium (CDA). Streptomycin was added to the medium for arresting bacterial growth. All plates were allowed to incubate at 30 °C in an incubator for 72 h for the fungal growth. The best-grown fungal colony was preserved in CDA slant. Slant cultures were routinely sub-cultured every 1 month prior to experimental use on the same medium; 8-d-old spore suspension was used as inoculum.

This strain of *A. niger* is being maintained in the laboratory of the Department of Biochemistry and Biophysics, University of Kalyani.

2.2. Preparation of fungal biomass

A. niger was grown by the shake flask method in aerobic condition. Liquid CD broth was used for growth of fungus and pH of the medium was maintained at 6.4 by suitable addition of 0.2 M NaOH solution. In total 100 mL of CD medium was transferred into a series of 500 mL conical flasks; the flasks were cotton plugged and autoclaved. After cooling down the CD medium to room temperature, equal amount of Streptomycin was added to both experimental and control flasks. The

conical flasks were inoculated with *A. niger* spores and shaken at 175 rpm at 32 °C in an orbital shaker. For metal biosorption and other enzymatic and biomolecular studies, four different concentrations of As (V), namely, 25, 50, 75 and 100 mg/L, were added separately to growth media. Biomass was harvested after 96 h growth period, filtered and washed with de-ionized water. Biomass was kept at –20 °C until used.

2.3. Microscopic studies of the fungus

Lactophenol–cotton blue staining technique was followed to stain the freshly grown mycelia and the morphology of the fungal strain was examined under phase contrast microscope.

2.4. Sample preparation for arsenic analysis

The arsenic standards were prepared by proper dilutions of stock solution of arsenic 1000 mg/L (MERCK, Germany).

Decomposition of samples: 0.2 g dry mass of mycelia and 2 mL of spent media were acidified with 5 mL concentrated sulfuric acid and heated to 160 °C for 2 h to obtain a minimum volume (0.2 mL) and this was made up to 10 mL with de-ionized water.

2.5. Arsenic analysis

Arsenic was analyzed using PerkinElmer AAnalyst 200 atomic absorption spectrometer equipped with mercury/hydride15 and a quartz tube atomizer. Argon gas (ultrahigh purity 99.995%) was used to sheath the atomizer and to purge internally. Arsenic hollow cathode lamp (PerkinElmer, USA) was used at a wavelength of 193.7 nm with a slit width of 0.7 nm.

Pre-reduction of samples for arsenic analysis is a very important step to convert arsenic to As (III) form in the sample solution. Pre-reduction was done according to the method described by Cernansky et al. (2007). A 5 mL aliquot of decomposed sample solution and standards was transferred to 50 mL volumetric flask. 20 mL double-distilled water, 5 mL concentrated HCl and 2 mL of 20% (w/v) KI solution were added. After 15 min, 2 mL of 10% (w/v) ascorbic acid solution was added and left for 1 h.

2.6. Measurement of absorbed arsenic by fungal biomass

Mycelia were washed thrice with de-ionized water to remove unbound arsenate; water was removed by squeezing the mycelia and they were kept at 45 °C for 2 h. 0.2 g of dried mycelia were taken and dissolved in concentrated sulfuric acid and prepared for arsenic analysis as mentioned above.

2.7. Intracellular arsenate uptake

0.2 g mycelia were ground using mortar and pestle with 0.6 g of alumina and extracted with 4 mL of 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). The homogenate was centrifuged at 1000g for 10 min at room temperature to discard the cell debris. The supernatant was collected and prepared for measurement of intracellular arsenic content by AAS.

2.8. Assay of total thiol (–SH) content

For total thiol assay, a modified (Ellman, 1959) method was followed. 0.2 g of fungal mycelia (grown at different metal concentrations) for each sample was taken and ground using a cold mortar and pestle with 0.6 g of alumina and extracted with 4 mL of 50 mM ice-cold phosphate buffer (pH 7.0) with and without 50 mM EDTA. The homogenate was centrifuged at 2000g for 20 min at 4 °C and the supernatant was collected. Three milliliters of the supernatant was mixed with 2 mL phosphate buffer (pH 7.0) and 5 mL distilled water and they were mixed well to get a 10 mL reaction mixture. Twenty microliters of 0.01 M DTNB solution was added to 3 mL of the reaction mixture, shaken well and absorbance was recorded at 412 nm. Thiol content was calculated using extinction coefficient $13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for DTNB at 412 nm.

2.9. Assay of toxicity biomarkers

2.9.1. Assay of catalase activity

0.5 g fresh mycelia was freeze-dried with liquid nitrogen and ground with an ice-cold mortar and pestle using 1 g alumina in 8 mL of 50 mM ice-cold phosphate buffer (pH 7.0) containing 1% polyvinylpyrrolidone in an ice bath. The homogenate was centrifuged at 15,000g for 20 min at 4 °C. The supernatant was used for assay of enzyme activity and the level of lipid peroxidation. Catalase activity was measured using the method of Chance and Maehly (1955). The reaction solution

(3 mL) contained 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 15 mM H_2O_2 , and 0.1 mL of enzyme extract. Reaction was initiated by adding the enzyme extract. Because of the linear decline of absorbance at 240 nm within the first 3 min, changes of the absorbance were read every minute. One unit CAT activity was defined as the absorbance change of 0.01 units per min. CAT activity was expressed on a protein basis.

2.9.2. Lipid peroxidation assay

Lipid peroxidation is considered as an indicator of oxidative stress. The content of malondialdehyde (MDA), a final product of lipid peroxidation, was determined using the method described by Dhindsa et al. (1981). A 0.5 mL aliquot of extract was added to 1 mL of 20% (v/v) trichloroacetic acid and 0.5% (v/v) thiobarbituric acid. The mixture was heated in a water bath at 95 °C for 30 min. After cooled to room temperature and centrifuged at 10,000g for 10 min, the supernatant was read for absorbance at 532 and 600 nm. The absorbance for nonspecific absorption at 600 nm was subtracted from the value at 532 nm. The amount of MDA (red pigment) was calculated using the adjusted absorbance and the extinction coefficient $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Heath and Packer, 1968).

2.9.3. Assay of superoxide dismutase and glutathione reductase activity

SOD activity was measured according to the method of Nishikimi et al. (1972) with slight modifications. The reaction mixture contained 0.2 mL 320 mM NBT, 0.2 mL 10 μM phenazine methosulfate, 2.0 mL 0.16 M pyrophosphate buffer (pH 9.2) and 0.02 mL enzyme extract. Enzyme extraction procedure was the same as mentioned for CAT activity determination. An enzyme blank was made with same amount of reagents. Reaction was started simultaneously in both sets by the addition of 0.2 mL 160 μM NADH and changes in absorbance at 560 nm were followed. After 90 s, 1 mL glacial acetic acid was added to each reaction tube from a different set with the same reaction conditions mentioned above and absorbance was read at 560 nm. The tubes for enzyme blank were then added with 0.2 mL of enzyme source and absorbance was read at 560 nm. One unit of SOD activity was defined as the amount of enzyme required to inhibit the reduction rate of NBT by 50%.

Glutathione reductase enzyme activity was determined spectrophotometrically at 25 °C, according to the method of Carlberg and Mannervik (1985). Enzyme extraction procedure was the same as mentioned for CAT activity determination. The assay system contained 500 mM potassium phosphate buffer (pH 7.3), including 1 mM EDTA, 1 mM GSSG and 4 mM NADPH solution. One enzyme unit is defined as the oxidation of 1 μmol NADPH per min under the assay condition.

2.9.4. Assay of succinate dehydrogenase activity

0.5 g fresh mycelia were freeze-dried with liquid nitrogen and ground with an ice-cold mortar and pestle using 1 g alumina and extracted with 0.5 M mannitol buffer containing 4 mM EDTA (pH 7.0). The homogenate was centrifuged at 15,000g for 20 min at 4 °C. The supernatant was used for assay of enzyme activity. Succinate dehydrogenase activity was measured by the method of Slater and Bonner (1952) in which the rate of reduction of potassium ferricyanide to potassium ferrocyanide by succinate was measured in the assay medium containing phosphate buffer (pH 7.6), 0.01 (M) potassium cyanide, 0.001 (M) potassium ferricyanide and 0.02 (M) sodium succinate in the final reaction mixture of 2.9 mL. One hundred microliters of supernatant was added to it and changes in absorbance at 420 nm were recorded at 15 s interval for 3 min. SDH activity was expressed as micromoles of potassium ferricyanide reduced/min/mg protein.

2.9.5. Proline assay

Proline assay was done by the method of Chinard (1952). 0.2 g fresh mycelia was ground with an ice-cold mortar and pestle using 0.4 g alumina and extracted with 4 mL of 3% sulfosalicylic acid. The homogenate was centrifuged at 2000g for 20 min. Two milliliters of the supernatant was pipetted into a 10 mL test tube and 2 mL glacial acetic acid and 2 mL acid-ninhydrin reagent were added to the supernatant. The tube was stoppered with a glass marble and heated to 100 °C for 45 min and subsequently placed in an ice bath to cool the tubes to room temperature and 4 mL toluene was added to each tube. The tubes were sealed with glass stoppers and shaken vigorously for 2 min and allowed to stay for 15 min for complete phase separation. Upper toluene layer was separated and kept in room temperature for 10 min and the red color intensity was read at 520 nm against toluene blank. The proline concentration was determined from a standard curve and calculated on a fresh weight basis (mM proline/gFW).

2.10. Protein measurement

The method of Lowry et al. (1951) was used to measure protein content in the above experiments.

2.11. Statistical analysis

Each experiment was repeated three times. Statistical analysis was done by one-way ANOVA followed by post-hoc multiple comparisons by Tukey method using spss 10. The difference was considered as significant when $p < 0.05$ and data have been provided as Supplementary material (Table 1).

3. Results

3.1. Growth of fungus

The effect of the added arsenate on the growth of *A. niger* was determined by measuring the dry weight of mycelia. Growth of the variants treated with arsenate during cultivation was compared with growth of the control strain (growth of the strain without arsenate in CD broth) in liquid medium. There was an initial increase in growth of fungal biomass after 96 h with the addition of 25 mg/L arsenate followed by decrease with addition of more arsenate, 50, 75 and 100 mg/L, respectively. The growth became severely reduced at 100 mg/L (Fig. 1a), while at 106 mg/L there was no growth at all.

In solid medium, however, there was a little increase in mycelial diameter till 72 h at 25 mg/L arsenate concentration after which the growth was steadily decreased at all subsequent fixation intervals till 192 h for all treatments with arsenate. A uniform trend of decrease was noted in mycelial diameter with addition of more amount of arsenate bringing more amount of reduction in growth of mycelia. Microscopic studies revealed deformities in mycelial sporangiophore, which showed lesser

number of spores (Fig. 1b–c), along with the increase in arsenic concentration in the medium.

3.2. Arsenic content in total biomass

Arsenate accumulation by *A. niger* mycelia was investigated as a function of initial arsenate concentration in CD broth. The total arsenic content in fungal biomass was measured as an indicator of arsenate absorption as well as adsorption by fungal biomass produced in presence of arsenate. Results showed that As content in total biomass increased with increase in arsenate concentration and maximum content was determined at 75 mg/L in liquid growth medium after which it was appreciably decreased in mycelia grown at 100 mg/L arsenate concentration (Fig. 2). The control group was not grown in presence of arsenate, so no arsenic was found in total biomass of the control group.

3.3. Intracellular arsenate uptake

The results for intracellular arsenic uptake were quite consistent with the findings of arsenic content in total fungal biomass. Intracellular As content gradually increased with the addition of more amount of arsenate in the growth medium and maximum uptake was determined at 75 mg/L. Least arsenate uptake was found at 100 mg/L arsenate concentration. Therefore from these data it appears that the intracellular uptake of arsenic was maximum at 75 mg/L (Fig. 3). The control group was not grown in presence of arsenate; arsenic was not found within the cells of the control group.

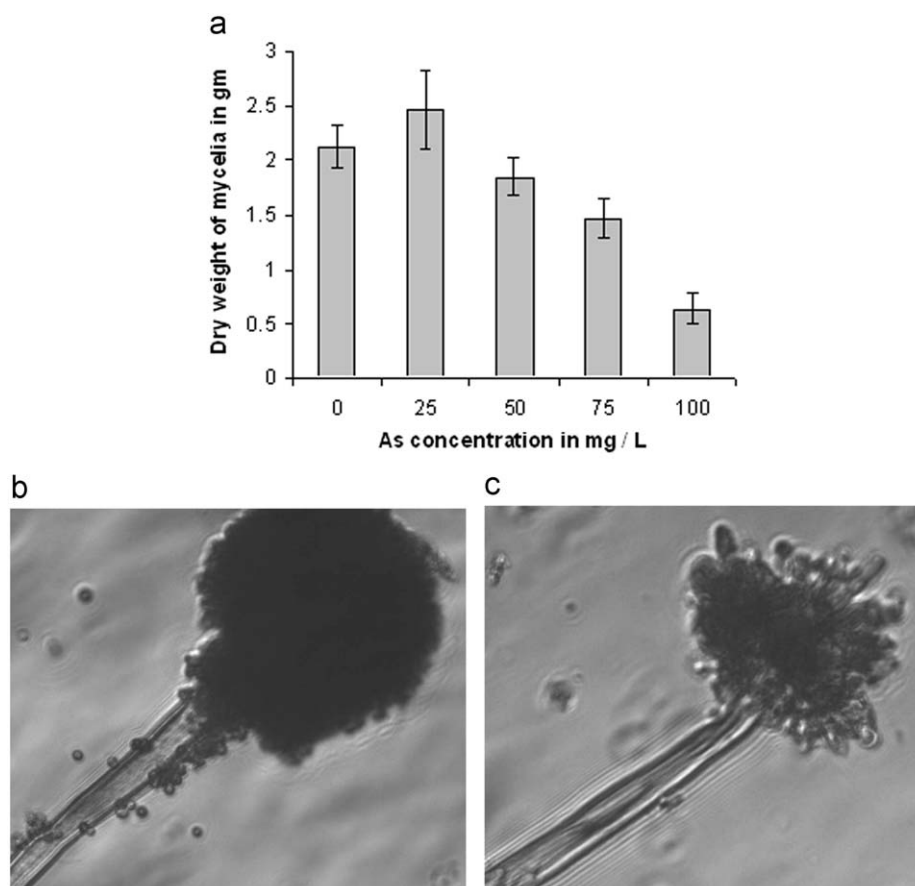


Fig. 1. (a–c) Dry weight of *A. niger* mycelia grown in liquid CD medium without (control) and with different arsenate concentration for 96 h (a); sporangiophore of *A. niger* grown in solid CD medium without arsenate (b); with 25 mg/L arsenate (c).

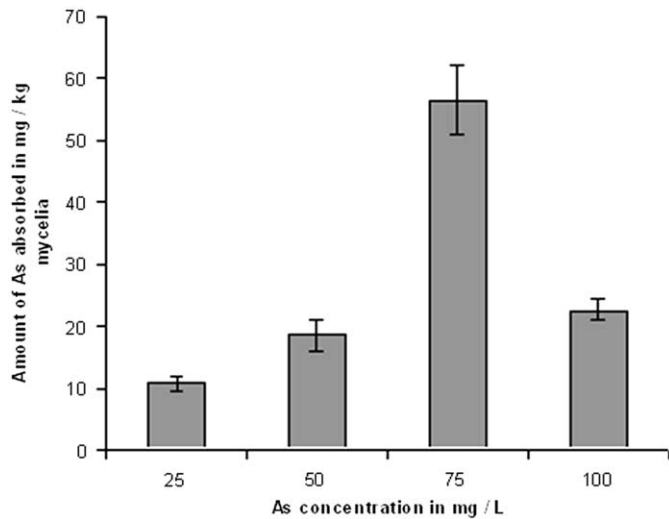


Fig. 2. Arsenic content absorbed by *A. niger* mycelia grown in CD broth with different arsenate concentration. Data were found to be significant at $P < 0.05$.

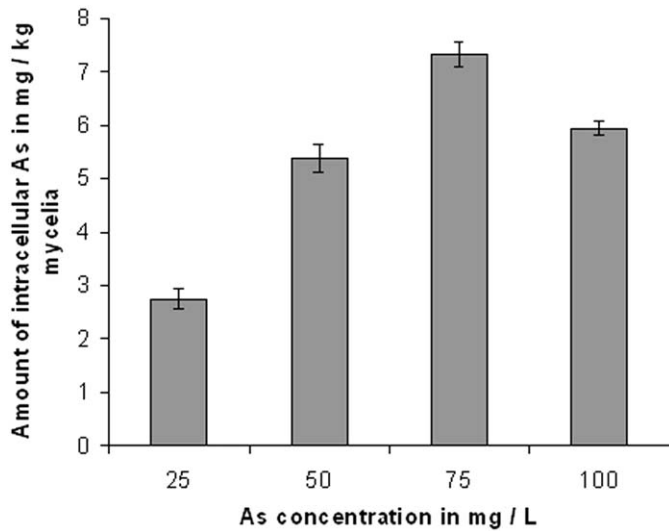


Fig. 3. Intracellular arsenate uptake by *A. niger*. Data were found to be significant at $P < 0.05$.

3.4. Arsenate content in spent medium

The arsenate content in spent medium was taken as a measure of inability of the fungal biomass to absorb or adsorb arsenate from the liquid growth medium. Results showed that the fungal biomass could uptake almost all arsenate content from the growth medium at 25 and 50 mg/L arsenate concentrations. However, at both 75 and 100 mg/L arsenate treatment groups (Fig. 4), high content of arsenate was found in the spent medium. Although intracellular arsenate uptake was maximum at 75 mg/L arsenate concentration, large amount of arsenate was found to be present in spent medium. This may be due to less amount of biomass formation at this arsenate concentration compared with biomass formed at 25 and 50 mg/L. Least biomass formation at 100 mg/L arsenate concentration also could be the reason for high arsenate content found in spent medium of 100 mg/L arsenate treatment. Arsenate was absent in spent medium of the control group growth.

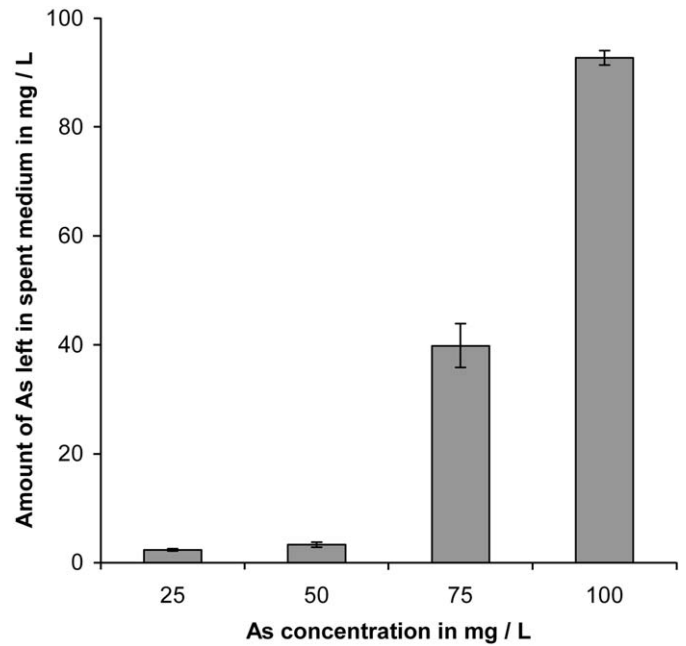


Fig. 4. Arsenate content in spent media after growth of *A. niger* for 96 h. Data were found to be significant at $P < 0.05$.

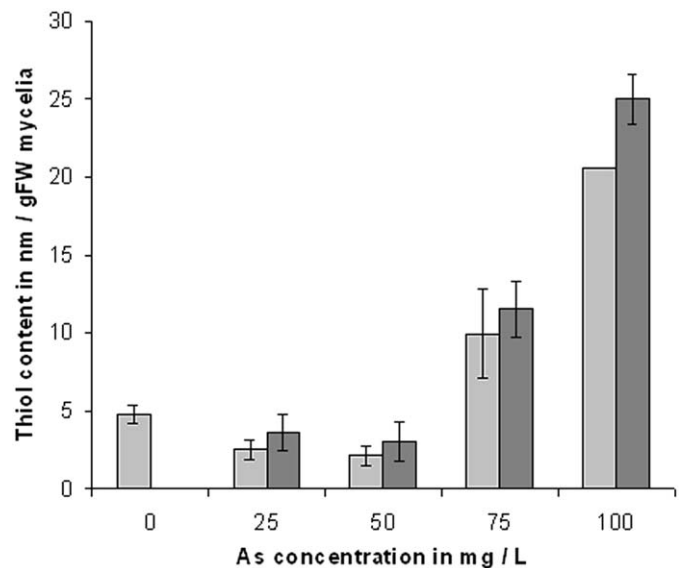


Fig. 5. Thiol leakage in spent media by *A. niger* mycelia. Light shaded and deep shaded bars represent thiol content without and with EDTA in the extraction buffer, respectively. Data were found to be significant at $P < 0.05$.

3.5. Thiol leakage

There was significant increase in thiol leakage by the fungal biomass grown at 75 and 100 mg/L arsenate concentration after an initial decrease till 50 mg/L treatment (Fig. 5) in both cases where EDTA has and has not been used in the extraction buffer. The values for thiol content were slightly higher when EDTA was used in extraction buffer due to the fact that EDTA can chelate As thus freeing the thiol groups for reaction with DTNB. When EDTA is not used, some thiol groups may be complexed with arsenic and cannot react with DTNB and hence lesser values are obtained for thiol contents. Increase in thiol leakage may be a part of efflux pumping of arsenic, by coupling with thiols, from fungal cells.

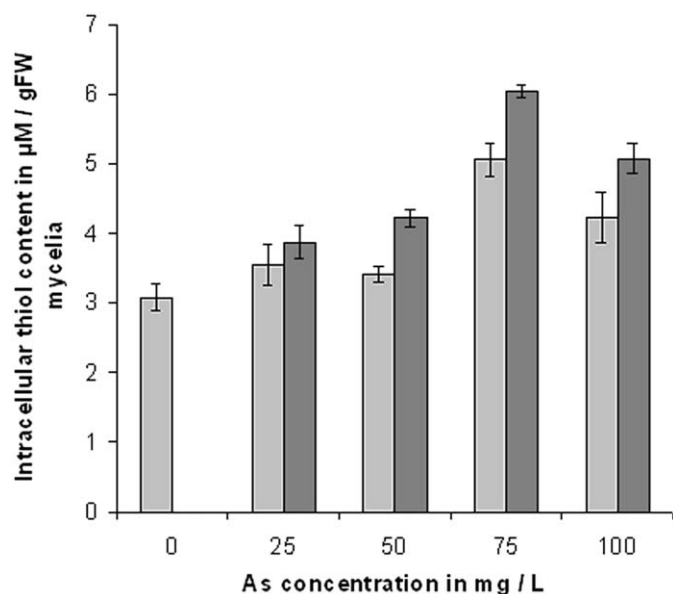


Fig. 6. Change in intracellular thiol content in response to arsenate treatment. Light shaded and deep shaded bars represent thiol content without and with EDTA in the extraction buffer, respectively. Data were found to be significant at $P < 0.05$.

3.6. Intracellular thiol content

The intracellular thiol content gradually increased with increased arsenate stress and was found to be maximum at 75 mg/L arsenate treatment after which it was reduced. In groups treated with EDTA in extraction buffer, the intracellular thiol content was found to be greater as compared with those where there was no EDTA in extraction buffer (Fig. 6). Increase in intracellular thiol content up to a certain arsenate concentration may indicate the role of thiols in tolerance or detoxification of arsenate by the strain. Higher values for thiol content were obtained when EDTA was used and these results were in accordance with the hypothesis that some of the thiol groups may form complex with arsenic as a part of tolerance or detoxification mechanism. Decrease in intracellular thiol content of the strain at 100 mg/L arsenate may indicate inability of the strain to tolerate such a drastic situation and disturbances induced by high arsenate concentration in cellular tolerance/detoxification mechanism.

3.7. Assay of catalase activity and extent of lipid peroxidation

The CAT activity initially increased upon metal treatment in concentrations up to 50 mg/L suggesting the fact that arsenate treatment induced anti-oxidative response in the test strain. Decrease in CAT activity was noticed with further increase in arsenate dose and very low activity was found at 100 mg/L arsenate concentration showing almost 3.2-fold decrease in enzyme activity (Fig. 7) suggesting that ROS generated at these arsenate doses provoked the inhibition of CAT activity.

MDA content of a cell is a reliable indicator of free radical formation. A more or less linear increase of MDA contents was found in response to increasing concentrations of arsenate (Fig. 8). After 96 h growth of the fungus, the MDA content increased by 201% at 25 mg/L with respect to control followed by a plateau region up to 75 mg/L. MDA content was then found to increase quite appreciably (by 292%) at 100 mg/L arsenate treatment. The gradual increase in MDA content indicated increased ROS generation by increased doses of arsenate and hence membrane damage by peroxidation of membrane lipids.

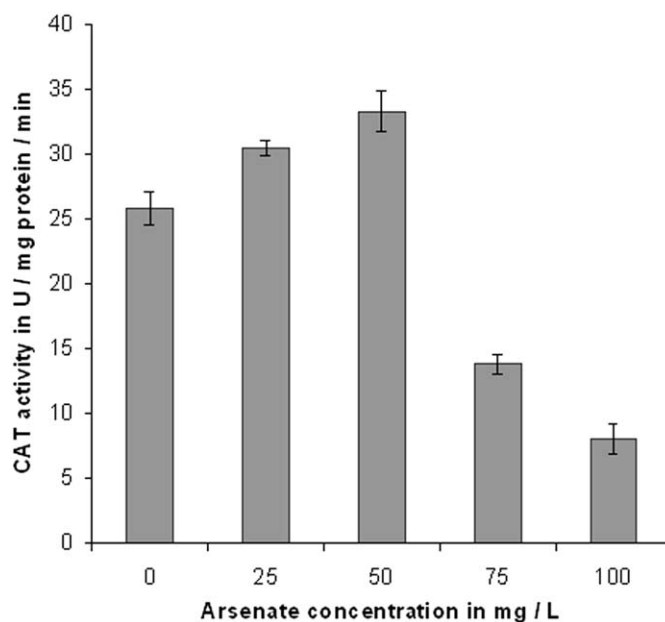


Fig. 7. Catalase activity in fungal mycelia grown at different arsenate concentration. Data were found to be significant at $P < 0.05$.

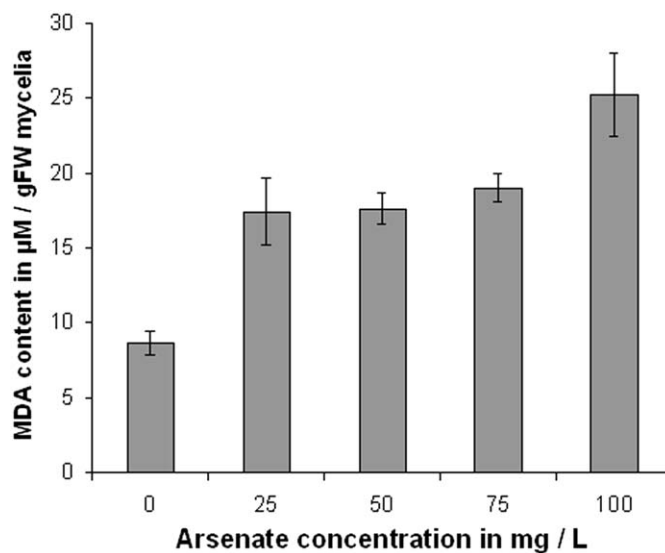


Fig. 8. Extent of lipid peroxidation induced by arsenate in *A. niger*.

3.8. Assay of superoxide dismutase and glutathione reductase activity

SOD activity was found to be maximum at 25 mg/L arsenate concentration and the increase was almost 9.3 fold in comparison to control. A gradual decrease was followed thereafter; however, this apparent decrease in enzyme activity was still greater than that of control by 6.8, 4.7 and 1.9 fold for 50, 75 and 100 mg/L, respectively (Fig. 9). The function of SOD is mainly to scavenge ROS formed in living cells. Higher values of SOD activity at different arsenate doses in comparison to that of control suggested that arsenate induced the formation of superoxide and other ROS.

GR activity sharply increased by almost 2 fold at 25 mg/L with respect to control indicating higher enzyme activity either in response to the superoxide anions formed due to arsenate toxicity,

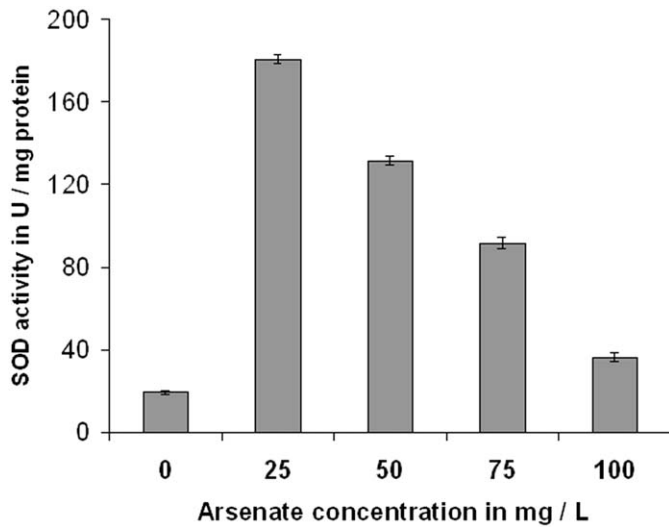


Fig. 9. Superoxide dismutase activity in fungal mycelia grown at different arsenate concentration. Data were found to be significant at $P < 0.05$.

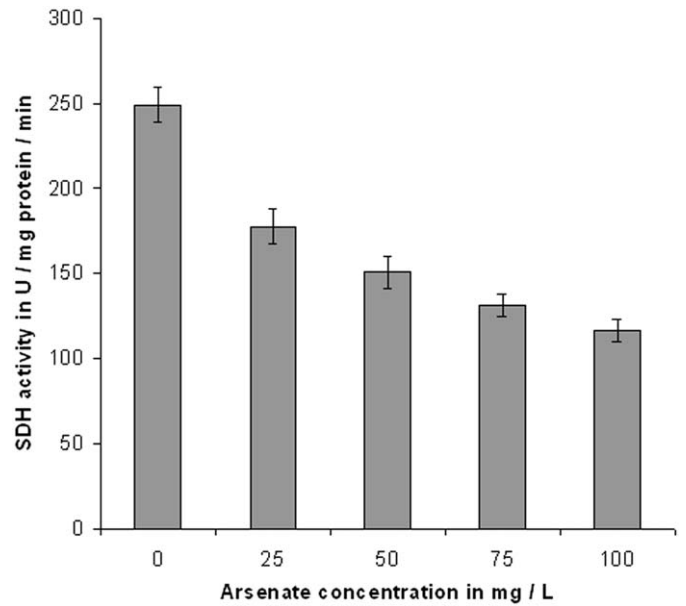


Fig. 11. Succinate dehydrogenase activity in fungal mycelia grown at different arsenate concentration. Data were found to be significant at $P < 0.05$.

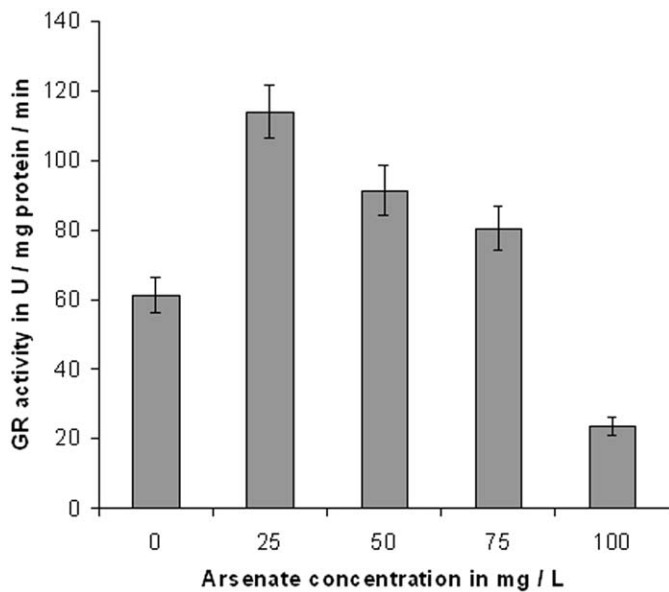


Fig. 10. Glutathione reductase activity in fungal mycelia grown at different arsenate concentration. Data were found to be significant at $P < 0.05$.

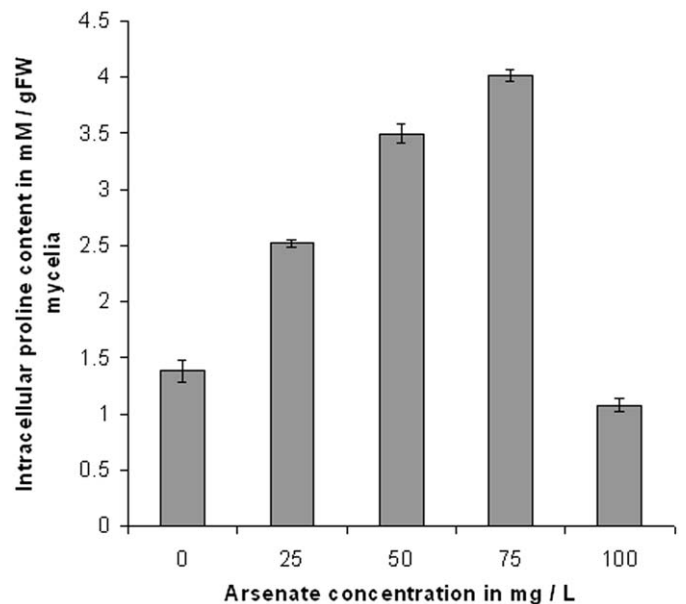


Fig. 12. Change in proline content in *A. niger* mycelia grown at different arsenate concentration. Data were found to be significant at $P < 0.05$.

or for more synthesis of glutathione to trap intracellular arsenic. A gradual decrease in enzyme activity was observed along with increase in arsenate concentration. The GR activity decreased by almost 2.6 times at 100 mg/L arsenate in comparison to control (Fig. 10). This decrease in enzyme activity is indicative of drastic stress of higher arsenate concentration on the test strain.

3.9. Assay of succinate dehydrogenase activity

SDH activity was found to be maximum for control. A gradual and consistent decrease in activity was noted with increase in arsenate concentration in the growth medium with minimum activity of the enzyme (decreased by 2.13 fold) at 100 mg/L arsenate (Fig. 11).

3.10. Proline assay

Proline accumulated in every fungal growth at different arsenate concentrations up to 75 mg/L. After 96 h growth, the proline content increased by 182%, 253% and 290%, respectively, at 25, 50 and 75 mg/L with respect to control. Increase in proline content may be a part of protective mechanism of the test strain as proline acts as a scavenger of hydroxyl radicals formed by arsenate toxicity inside the cell. However, decrease in proline content at 100 mg/L arsenate concentration indicated disturbance in cellular detoxification mechanism showing once again that this concentration of arsenate is very drastic for the test strain to cope up (Fig. 12).

4. Discussion

From the data of the present study it would appear that growth of *A. niger* apparently was slightly stimulated with the addition of 25 mg/L arsenate, the lowest dose used in the present study. This result is similar to those obtained for growth of *A. nidulans* in presence of cadmium (Cooley et al., 1986; Guelfi et al., 2003). Similarly, it is possible that low concentrations of arsenate stimulated growth by forming complexes with constituents of the culture medium, which could allow essential trace elements to become available to the fungus. Alternatively, arsenate may provoke an Arndt–Schultz effect on the test strain. This results in the accumulation of toxins in non-lethal concentrations at the cell surface to cause alteration in the cellular permeability. This in turn leads to a more free flow of nutrients within the cells and thus metabolic activity increases (Lamanna et al., 1973; Babich and Stotzky, 1980; Ahonen-Jonnarth et al., 2004). With increase in arsenate treatment, there was not only more arsenic content found in the spent medium particularly at 75 and 100 mg/L but also an appreciable increase in thiol leakage. This would indicate that there was considerable effort made by the fungus to get rid of excess toxicity by mobilizing thiols to trap arsenic and remove it outside the cell.

In our present study, thiol leakage was not found to be significant up to 50 mg/L arsenate concentration, the reason for which was unclear. One explanation could be that the test strain was less disturbed with arsenate toxicity up to 50 mg/L arsenate concentration for its inherent greater tolerance.

One strain of *Aspergillus* sp. P37 isolated from Rio Tinto (Canovas et al., 2004) was reported earlier to be highly resistant to arsenate, where the role of a thiol species (reduced glutathione, GSH) was emphasized for its hypertolerance (Canovas et al., 2004). This contention was made because free thiols or glutathione can bind to a variety of substrates that are thus inactivated and, in some cases, channeled towards specific detoxification mechanisms (Pompella et al., 2003). Fungi have evolved various strategies for resistance to arsenic and other heavy metals (Rosen, 1999; Ghosh et al., 1999). Like in *A. niger*, another fungus *S. cerevisiae* is also reported to have the ability to tolerate a certain level of arsenic exposure (Canovas et al., 2004).

In the present study, there was an increase in the accumulation of GSH when arsenic was treated in greater concentration. Such an accumulation could contribute to arsenate detoxification in different ways (Rosen, 2002) such as

(i) GSH can serve as the electron donor in enzyme-catalyzed arsenate reduction and arsenate reduction is a prerequisite for arsenic efflux from cells.

(ii) GSH can bind arsenite to form $\text{As}(\text{GS})_3$, which allows sequestration in vacuoles mediated by ATP-binding cassette-type glutathione transporters.

In the present study, when a chelating agent EDTA was used in the extraction buffer, arsenic was chelated making more thiols free to react with thiol-specific reagent DTNB and resulting in an increase of thiol content as compared to when there was no addition of EDTA in the extraction buffer. This would indicate that conjugation of thiols and arsenate forms a thiol–arsenate complex, which may have a role in detoxification as previously seen for several other species (Gailer and Lindner, 1998; Schmoger et al., 2000; Ghosh et al., 1999). More amount of thiol leakage was obtained in the spent medium when the chelator had been used in the extraction buffer in comparison to when it was not used. This could possibly be due to the presence of thiol–arsenic compounds in the spent medium.

From results of growth of mycelia in solid medium and microscopic analysis, it was revealed that sporulation specificity was being gradually decreased along with increase in arsenate

concentration, but at 25 mg/L concentration, it was not affected much.

From the results of the present study, it is evident that the dose response evoked differential levels of activities in respect of the different biomarkers, while the peak activity of catalase was found to be at 50 mg/L, it was 25 mg/L for GR, SOD and SDH. Except for SDH activity, the activities of all other enzymes were triggered for enhancement apparently to combat the cellular toxicity.

The use of lipid peroxidation as molecular marker of toxicity in cellular environment has been made in a variety of living organisms (Zhang et al., 2007; Pathak et al., 2006; Biswas et al., 2008) including in yeast (Howlett and Avery, 1997). Increased levels of MDA have also been reported in bean plants (Stoeva et al., 2005) and hyper-accumulator as well as sensitive ferns (Srivastava et al., 2005) exposed to arsenic. However, heavy metal-induced lipid peroxidation study in fungus is rather scanty. In the present study, the LPO was increased steadily at the increase of arsenate doses and this increase is an indicator of arsenic-induced oxidative damage. Very high values of MDA are indicative of impairment of cell defense system due to high doses of arsenate (75 and 100 mg/L arsenate).

Catalases are known to be involved as one of the mechanisms that protect cells against the damage caused by H_2O_2 and reactive oxygen species (ROS) to cellular components including nucleic acids, lipids and proteins (Imlay and Linn, 1988). Production of catalase as a stress response can involve pollutant stress (arsenate in the present study) and tolerance of microorganisms to other environmental stresses that also induce CAT production in *A. niger* (Fiedurek, 2000; Scandalios, 2002). Induction of CAT activity with arsenic exposure has been reported previously in arsenic hyper-accumulator and sensitive fern species (Srivastava et al., 2005). Increased CAT activity was found in maize due to arsenic stress (Mylona et al., 1998). Buckova et al. (2005) also reported earlier an increase in CAT activity in *A. niger* as a result of arsenate stress. The increase in CAT activity at 25 and 50 mg/L arsenate treatment would indicate that there is an effort on part of the fungus to neutralize or minimize the hazardous effect of ROS generated by arsenate.

Similarly GR is also known to be involved in detoxification of hydrogen peroxide in the chloroplast and mitochondria (Foyer and Halliwell, 1976). GR maintains a high ratio of reduced glutathione (GSH) to oxidized glutathione (GSSG), as the latter is toxic to cells and this role of GR has been demonstrated by analyzing fungal mutants lacking this enzyme (Grant et al., 1998; Jamieson, 1998; Guelfi et al., 2003). Increase in CAT activity along with GR has been reported in the moss shoot by these authors and believed to reflect a constant detoxification of hydrogen peroxide. On the other hand, CAT and GR activities have been reported to be inhibited in the moss *Taxithelium nepalense* Broth and in *Oryza sativa* roots in response to toxicities generated by various heavy metals including arsenic (Panda, 2003; Choudhury and Panda, 2004). GR activity increased significantly for our test strain grown at 25 mg/L arsenate after 96 h.

SOD is an important enzyme involved in scavenging the superoxide radicals (Panda, 2002). Increase in SOD activity has been reported earlier in the moss *T. nepalense* in response to lead, zinc, copper and arsenic toxicity. Therefore increase in SOD activity at 25 mg/L arsenate concentration may indicate detoxification of superoxide radicals generated by arsenate treatment in the test strain. Decrease in SOD activity with further increase in arsenate stress may be due to reduction of SOD activity at higher arsenate concentrations within the cells as intracellular arsenic content increased up to 75 mg/L arsenate treatment. However, further decrease in SOD activity at 100 mg/L arsenate treatment may be indicative of disturbances in anti-oxidative defense due to intolerance of the test strain at such a high arsenate concentration as revealed from the activities of CAT and GR also.

Proline is one proteinogenic amino acid that subserves a variety of cellular functions. It can function as an osmolyte radical scavenger, electron sink, stabilizer of macromolecules and a cell wall component (Matysik et al., 2002). In high metal-tolerant populations, proline is found to be constitutively in high contents. This tempts one to assume a function for proline in increased metal tolerance (Sharma and Dietz, 2006; Siripornadulsil et al., 2002). Consistent with this report, in the present study, there was a linear increase in proline content up to 75 mg/L of arsenate treatments in *A. niger* after which it drastically declined. Proline is also known to detoxify the ROS under stress (Smirnov, 1993), but it appears that the mechanism becomes disorganized after the arsenate concentration reaches its threshold at 75 mg/L.

Toxic metals generally enter cells and encounter the metabolically active mitochondria to inflict damage resulting in its diminished ability to produce enzymes like cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase (Dixit et al., 2002). Therefore, the gradual and steady decrease of succinate dehydrogenase activity in the present study along with increase of arsenate dose is consistent with this hypothesis.

Thus, cells of *A. niger* are equipped with an elaborate network of anti-oxidative enzymes, that are involved in scavenging ROS and other oxidative products generated by arsenate insult.

Bio-volatilization of arsenic has been reported for different fungal strains like *Penicillium* sp. (Visoottiviseth and Panviroj, 2001) and *S. brevicaulis* (Pearce et al., 1998). *A. niger* B strain was also found to be one of the most efficient strains to bio-volatilize arsenic (Urik et al., 2007) at 5–20 mg/L arsenate concentrations. Iron oxide-coated *A. niger* biomass has been used in arsenic removal from aqueous solution by adsorption (Pokhrel and Viraraghavan, 2006). *Neosartorya fischeri* biomass, in compact and in palletized forms, has also been able to absorb arsenate from aqueous systems with 2.5 mg/L initial arsenate concentration (Cernansky et al., 2007). Use of adapted *A. niger* for bioleaching of toxic metals has previously been reported where it was seen that unadapted *A. niger* did not grow possibly due to the toxicity of heavy metals (Santhiya and Ting, 2006). Hence most strains generally are (i) either not able to withstand high arsenic concentration or (ii) should be modified to some extent for effective arsenic removal. Reports are scanty for availability of wild-type fungal strains that can grow at a rather high concentration, biosorb arsenic, can retain it within the cell and thus contribute to an effective bioremediation process. On the other hand, adsorption of arsenic by previously grown biomass of microorganisms may not be a promising step in bioremediation as there would be huge possibility of the metalloids to get removed from the surface of biomass.

5. Conclusion

This wild-type strain of *A. niger* under study was found to show arsenate tolerance much more than reported for some other strains of fungus. The strain needed no special modification or adaptation to be able to thrive even in a medium with 100 mg/L arsenate, an unusually high concentration for most other living organisms to survive and showed some inherent mechanisms for arsenate tolerance. The overall results of this study would render evidence that this strain of *A. niger* was able to adsorb arsenate on its biomass to a considerable extent as revealed from the data of arsenic content in total biomass and intracellular arsenate uptake. This fact may give this fungus a promising step forward for its possible future role as a suitable model of microorganism for removal of arsenic from high-risk arsenic-contaminated areas.

Acknowledgements

The work was financially supported partly by the University of Kalyani and partly by a grant sanctioned to Prof. A.R. Khuda-Bukhsh, Department of Zoology, University of Kalyani by Boiron Laboratory, Lyon, France.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ecoenv.2009.09.015

References

- Anon-Jonnarth, U., Roitto, M., Markkola, A.M., Ranta, H., Neuvonen, S., 2004. Effects of nickel and copper on growth and mycorrhiza of Scots pine seedlings inoculated with *Gremmeniella abietina*. For. Pathol. 34, 337–348.
- Alia, Mohanty, P., Matysik, J., 2001. Effect of proline on the production of singlet oxygen. Amino Acids 21, 195–200.
- Alia, Saradhi, P.P., 1991. Proline accumulation under heavy metal stress. J. Plant Physiol. 138, 504–508.
- Alia, Saradhi, P.P., Mohanty, P., 1997. Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage. J. Photochem. Photobiol. B 38, 253–257.
- Aung, K.M., Ting, Y.P., 2005. Bioleaching of spent fluid catalytic cracking catalyst using *Aspergillus niger*. J. Biotechnol. 116, 159–170.
- Babich, H., Stotzy, G., 1980. Environmental factors that influence the toxicity of heavy metals and gaseous pollutants to microorganisms. CRC Crit. Rev. Microbiol. 8, 99–145.
- Biswas, S.J., Bhattacharjee, N., Khuda-Bukhsh, A.R., 2008. Efficacy of a plant extract (*Chelidonium majus* L.) in combating induced hepatocarcinogenesis in mice. Food Chem. Toxicol. 46, 1474–1487.
- Buckova, M., Godocikova, J., Simonovicova, A., Polek, B., 2005. Production of catalases by *Aspergillus niger* isolates as a response to pollutant stress by heavy metals. Curr. Microbiol. 50, 175–179.
- Buckova, M., Godocikova, J., Polek, B., 2007. Responses in the mycelial growth of *Aspergillus niger* isolates to arsenic contaminated environments and their resistance to exogenous metal stress. J. Basic Microbiol. 47, 295–300.
- Cai, L., Liu, G., Rensing, C., Wang, G., 2009. Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. BMC Microbiol. 9, 4.
- Canovas, D., Duran, C., Rodriguez, N., Amils, R., de Lorenzo, V., 2003. Testing the limits of biological tolerance to arsenic in a fungus isolated from the River Tinto. Environ. Microbiol. 5, 133–138.
- Canovas, D., Vooijs, R., Schat, H., de Lorenzo, V., 2004. The role of thiol species in the hypertolerance of *Aspergillus* sp. P37 to arsenic. J. Biol. Chem. 279, 51234–51240.
- Cao, X., Ma, L.Q., Shiralipour, A., 2003. Effects of compost and phosphate amendments on arsenic mobility in soils and arsenic uptake by the hyperaccumulator *Pteris vittata* L. Environ. Pollut. 126, 157–167.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase assay. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), Methods in Enzymology, vol. 113. Academic Press, Orlando, FL, pp. 484–495.
- Cernansky, S., Urik, M., Sevc, J., Khun, M., 2007. Biosorption and biovolatilization of arsenic by heat resistant fungi. Environ. Sci. Pollut. Res. 14, 31–35.
- Chakraborti, D., Mukherjee, S.C., Pati, S., Sengupta, M.K., Rahman, M.M., Chowdhury, U.K., Lodh, D., Chanda, C.R., Chakraborti, A.K., Basu, G.K., 2003. Arsenic groundwater contamination in middle Ganga plain, Bihar, India: a future danger. Environ. Health Perspect. 111, 1194–1201.
- Chance, B., Maehly, A.C., 1955. Assay of catalases and peroxidases. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), Methods in Enzymology, vol. 2. Academic Press, New York, pp. 764–775.
- Chinard, F.P., 1952. Photometric estimation of proline and ornithine. J. Biol. Chem. 199, 91–95.
- Chou, W., Jie, C., Kenedy, A., Jones, R.J., Tzrush, M.A., Dang, C.V., 2004. Role of NADPH oxidase in arsenic-induced reactive oxygen species formation and cytotoxicity in myeloid leukemia cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 101, 4578–4583.
- Choudhury, S., Panda, S.K., 2004. Induction of oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under lead (Pb) and arsenic (As) phytotoxicity. Curr. Sci. 87, 342–348.
- Cobbett, C.S., 2000. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. Curr. Opin. Plant Biol. 3, 211–216.
- Cooley, R.N., Thurman, D.A., Tomsett, A.B., 1986. Molecular mechanisms of heavy metal tolerance in *Aspergillus nidulans*. Heredity 57, 133–134.
- Delauney, A.J., Verma, D.P.S., 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. Plant J. 4, 215–223.
- Dhankher, O.P., Li, Y., Rosen, B.P., Shi, J., Salt, D., Senecoff, J.F., Sashti, N.A., Meagher, R.B., 2002. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants

- by combining arsenate reductase and γ -glutamylcysteine synthetase expression. *Nat. Biotechnol.* 20, 1140–1145.
- Dhar, R.K., Biswas, B.K., Samanta, G., Mandal, B.K., Chakraborti, D., Roy, S., Jafar, A., Islam, A., Ara, G., Kabir, S., Khan, A.W., Ahmed, S.A., Hadi, S.A., 1997. Groundwater arsenic calamity in Bangladesh. *Curr. Sci.* 73, 48–59.
- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P., Thorpe, T.A., 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.* 32, 93–101.
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R., 2002. Chromium ions inactivate electron transport and enhance superoxide generation in vivo in pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) root mitochondria. *Plant Cell Environ.* 25, 687–693.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77.
- Farago, M.E., Mullen, W.A., 1979. Plants which accumulate metals. Part IV. A possible copper-proline complex from the roots of *Armeria maritima*. *Inorg. Chim. Acta* 32, L93–L94.
- Fiedurek, J., 2000. Production of *Aspergillus niger* catalase under various stress conditions. *Acta Microbiol. Pollut.* 1, 43–49.
- Foyer, C., Halliwell, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: a proposed system for ascorbic metabolism. *Planta* 133, 21–25.
- Gailer, J., Lindner, W., 1998. On-column formation of arsenic-glutathione species detected by size-exclusion chromatography in conjunction with arsenic-specific detectors. *J. Chromatogr.* 716, 83–93.
- Ghosh, M., Shen, J., Rosen, B.P., 1999. Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5001–5006.
- Grant, C.M., Perrone, G., Dawes, I.W., 1998. Glutathione and, catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 893–898.
- Guelfi, A., Azevedo, R.A., Lea, P.J., Molina, S.M.G., 2003. Growth inhibition of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* by cadmium: an antioxidant enzyme approach. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 49, 63–73.
- Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Meharg, A.A., 2001. Copper and arsenate-induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity. *Plant Cell Environ.* 24, 713–722.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 189–198.
- Hovlett, N.G., Avery, S.V., 1997. Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2971–2976.
- Imlay, J.A., Linn, S., 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240, 1302–1309.
- Jamieson, D.J., 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1511–1527.
- Kapoor, A., Viraraghavan, T., 1995. Fungal biosorption—an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. *Bioresour. Technol.* 53, 195–206.
- Kapoor, A., Viraraghavan, T., 1997. Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol.* 61, 221–227.
- Kapoor, A., Viraraghavan, T., Cullimore, D.R., 1999. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol.* 70, 95–104.
- Knudson, J.A., Meikle, T., DeLuca, T.H., 2003. Ecosystem restoration role of mycorrhizal fungi and phosphorus in the arsenic tolerance of basin wildrye. *J. Environ. Qual.* 32, 2001–2006.
- Kuznetsov, V.V., Shevyakova, N.I., 1997. Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity: proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. *Physiol. Plant.* 100, 320–326.
- Lamanna, C., Malette, M.F., Zimmerman, L., 1973. Stimulation by poisons. In: *Basic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1026–1030.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Mandal, B.K., Roy Chowdhury, T., Samanta, G., Basu, G.K., Chowdhury, P.P., Chanda, C.R., Lodh, D., Karan, N.K., Dhar, R.K., Tamili, D.T., Das, D., Saha, K.C., Chakraborti, D., 1997. Chronic arsenic toxicity in West Bengal. *Curr. Sci.* 72, 114–117.
- Mascher, R., Lippmann, B., Holzinger, S., Bergmann, H., 2002. Arsenate toxicity: effect on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Sci.* 163, 961–969.
- Matysik, J., Alia Bhalu, B., Mohanty, P., 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Curr. Sci.* 82, 525–532.
- Mehta, S.K., Gaur, J.P., 1999. Heavy metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *New Phytol.* 143, 253–259.
- Montillet, J.-L., Chamnongpol, S., Rusterucci, C., Dat, J., Van de Cotte, B., Agnel, J.-P., Battesti, C., Inze, D., Van Breusegem, F., Triantaphyllides, C., 2005. Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 138, 1516–1526.
- Mukherjee, A., Sengupta, M.K., Hossain, M.A., Ahamed, S., Das, B., Nayak, B., Lodh, D., Rahman, M.M., Chakraborti, D., 2006. Arsenic contamination in groundwater: a global perspective with emphasis on the Asian scenario. *J. Health Popul. Nutr.* 24, 142–163.
- Mylyona, P.V., Polidoros, A.N., Scandalios, J.G., 1998. Modulation of antioxidant responses by arsenic in maize. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 576–585.
- Nishikimi, M., Appaji, N., Yagi, K., 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 849–854.
- Ordóñez, E., Letek, M., Valbuena, N., Gil, J.A., Mateos, L.M., 2005. Analysis of genes involved in arsenic resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6206–6215.
- Paleg, L.G., Stewart, G.R., Bradbeer, J.W., 1984. Proline and glycine betaine influence protein salivance. *Plant Physiol.* 75, 974–978.
- Panda, S.K., 2002. The biology of oxidative stress in green cells: a review. In: Panda, S.K. (Ed.), *Advances in Stress Physiology of Plants*. Scientific Publishers, India, pp. 1–13.
- Panda, S.K., 2003. Heavy metal phytotoxicity induces oxidative stress in a moss *Taxithellium* sp. *Curr. Sci.* 84, 631–663.
- Pathak, S., Das, J.K., Biswas, S.J., Khuda-Bukhs, A.R., 2006. Protective potentials of a potentized homeopathic drug, Lycopodium-30, in ameliorating azo dye induced hepatocarcinogenesis in mice. *Mol. Cell. Biochem.* 258, 121–131.
- Pearce, R.B., Callow, M.E., Macaskie, L.E., 1998. Fungal volatilization of arsenic and antimony and the sudden infant death syndrome. *FEMS Microbiol. Lett.* 158, 261–265.
- Pokhrel, D., Viraraghavan, T., 2006. Arsenic removal from an aqueous solution by a modified fungal biomass. *Water Res.* 40, 549–552.
- Pompella, A., Athanase, V., Aldo, P., Vincenzo, D.T., Alessandro, C., 2003. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1499–1503.
- Rauser, W.E., 1995. Phytochelatins and related peptides. *Plant Physiol.* 109, 1141–1149.
- Ren, W.X., Li, P.J., Geng, Y., Li, X.J., 2009. Biological leaching of heavy metals from a contaminated soil by *Aspergillus niger*. *J. Hazard. Mater.* 167, 164–169.
- Rosen, B.P., 1999. Families of arsenic transporters. *Trends Microbiol.* 7, 207–212.
- Rosen, B.P., 2002. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett.* 529, 86–92.
- Santhiya, D., Ting, Y.P., 2005. Bioleaching of spent refinery processing catalyst using *Aspergillus niger* excreting high-yield oxalic acid. *J. Biotechnol.* 116, 171–184.
- Santhiya, D., Ting, Y.P., 2006. Use of adapted *Aspergillus niger* in the bioleaching of spent refinery processing catalyst. *J. Biotechnol.* 121, 62–74.
- Scandalios, J.G., 2002. The rise of ROS. *Trends Biochem. Sci.* 27, 483–486.
- Schat, H., Sharma, S.S., Vooijs, R., 1997. Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiol. Plant.* 101, 477–482.
- Schmoger, M.E., Oven, M., Grill, E., 2000. Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiol.* 122, 793–801.
- Shah, K., Dubey, R.S., 1998. Effect of cadmium on proline accumulation and ribonuclease activity in rice seedlings: role of proline as a possible enzyme protectant. *Biol. Plant.* 40, 121–130.
- Sharma, S.S., Dietz, K.J., 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J. Exp. Bot.* 57, 711–726.
- Shri, M., Kumar, S., Chakraborty, D., Trivedi, P.K., Mallick, S., Misra, P., Shukla, D., Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Tuli, R., 2008. Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1102–1110.
- Singh, H.P., Batish, D.R., Kohli, R.K., Arora, K., 2007. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. *Plant Growth Regul.* 53, 65–73.
- Singh, N., Ma, L.Q., Srivastava, M., Rathinasabapathi, B., 2005. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L. *Plant Sci.* 170, 274–282.
- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D.P.S., Sayre, R.T., 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell* 14, 2837–2847.
- Slater, E.C., Bonner, W.D., 1952. Effect of fluoride on succinate oxidase system. *Biochem. J.* 52, 185–196.
- Smirnoff, N., Cumbes, Q.J., 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28, 1057–1060.
- Smirnoff, N., 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* 125, 27–58.
- Srivastava, M., Ma, L.Q., Singh, N., Singh, S., 2005. Antioxidant response of hyper-accumulator and sensitive fern species to arsenic. *J. Exp. Bot.* 56, 1335–1342.
- Srivastava, S., Thakur, I.S., 2006. Evaluation of bioremediation and detoxification potentiality of *Aspergillus niger* for removal of hexavalent chromium in soil microcosm. *Soil Biol. Biochem.* 38, 1904–1911.
- Stoeva, N., Berova, M., Zlatev, Z., 2005. Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants. *Biol. Plant.* 49, 293–296.
- Taylor, C.B., 1996. Proline and water deficit. Ups, downs, ins and outs. *Plant Cell* 8, 1221–1224.
- Todorova, D., Nedeva, D., Abrashev, R., Tsekova, K., 2008. Cd (II) stress response during the growth of *Aspergillus niger* B77. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1541–1547.
- Torma, A.E., 1988. Leaching of metals. In: In: Rehn, H.J. (Ed.), *Biotechnology: Comprehensive Treatise, Microbial Processes*, vol. 6a. VCH Publishers, New York, pp. 367–399.
- Urik, M., Cernansky, S., Sevc, J., Simonovicova, A., Littera, P., 2007. Biovolatilization of arsenic by different fungal strains. *Water Air Soil Pollut.* 186, 337–342.
- Verma, D.P.S., 1999. Osmotic stress tolerance in plants: role of proline and sulfur metabolisms. In: Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (Eds.), *Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants*. R.G. Landers, Austin, TX, pp. 153–168.
- Visoottiviseth, P., Panviroj, N., 2001. Selection of fungi capable of removing toxic arsenic compounds from liquid medium. *Sci. Asia* 27, 83–92.

- Wasay, S.A., Barrington, S.F., Tokunaga, S., 1998. Using *Aspergillus niger* to bioremediate soils contaminated by heavy metals. *Biorem. J.* 2, 183–190.
- Wu, J-T., Chang, S.C., Chen, K-S., 1995. Enhancement of intracellular proline level in cells of *Anacystis nidulans* (cyanobacteria) exposed to deleterious concentrations of copper. *J. Phycol.* 31, 376–379.
- Wu, J-T., Hsieh, M-T., Kow, L-C., 1998. Role of proline accumulation in response to toxic copper in *Chlorella* sp. (chlorophyceae) cells. *J. Phycol.* 34, 113–117.
- Zhang, F.Q., Wang, Y.S., Lou, Z.P., Dong, J.D., 2007. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*). *Chemosphere* 67, 44–50.
- Zhang, W., Cai, Y., Downum, K.R., Ma, L.Q., 2004. Thiol synthesis and arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata* (Chinese brake fern). *Environ. Pollut.* 131, 337–345.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

Titre

Réponse antioxydante d'*Aspergillus niger* au stress induit par l'arsenic.

Résumé

La contamination des sols par les métaux toxiques est un problème environnemental généralisé résultant de l'industrialisation mondiale au cours des dernières années. Certaines techniques de remédiation pour détoxifier les sols sont présentées, en se concentrant sur l'utilisation de plantes présentant des capacités de survie dans les sols contenant des métaux lourds ainsi que sur la fonction de certains microorganismes dans le processus de remédiation. L'objectif de cette étude est d'analyser et d'expliquer les mécanismes cellulaires et antioxydants d'*Aspergillus niger* pour la dépollution des sites pollués par l'arsenic. Les résultats montrent que l'effet toxique de l'arsenic sur *Aspergillus niger* s'est traduit par une diminution de sa croissance, cette même souche a accumulé dans sa biomasse des quantités importantes d'As mettant en évidence sa grande tolérance à ce métalloïde. En ce qui concerne les indicateurs du niveau de stress oxydants les résultats montrent que le MDA augmente avec l'augmentation des doses d'As dans le milieu de culture. Tandis que les activités antioxydantes de la CAT sont corrélées avec les doses d'arsenic, or les activités de la SOD ne le sont pas. Ces résultats suggèrent qu'*A. niger* a un potentiel d'accumulation d'arsenate et peut tolérer le stress oxydatif en développant des mécanismes de défense antioxydante, ce qui, confère à cette souche la capacité d'être exploitée pour l'élimination de l'arsenic des environnements contaminés.

Mot clés : Arsenic, *Aspergillus niger*, biomarqueurs de toxicité, réponse antioxydante, Bioremédiation

Membre du jury :

Président du jury : **BOULAHROUF Khaled** (MCB- UFM Constantine).

Rapporteur : **MEGHNOUS Ouissem** (MAB- UFM Constantine).

Examineurs : **BOUCHERIT Zayneb** (MAA- UFM Constantine).

Présentée par :

BOUDEFA Mouna

BOUKERB Lina Rayene

IMENESSEN Fouad

Année universitaire : 2020-2021