

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Mycologie et biotechnologie fongique

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Impact du stress salin sur la réponse antioxydante d'*Aspergillus tubingensis*

Présenté par : AYAT Chaima

Le 26/06/2022

DJERAFI Salima

MOUALDI Hadil Nour El Yakine

Jury d'évaluation :

Encadreur : MEGHNOUS Ouissem (MAB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : ABDELAZIZ Ouided (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : BOULAHROUF Khaled (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire
2021 - 2022

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Mycologie et biotechnologie fongique

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Impact du stress salin sur la réponse antioxydante d'*Aspergillus tubingensis*

Présenté par : AYAT Chaima

Le 26/06/2022

DJERAFI Salima

MOUALDI Hadil Nour El Yakine

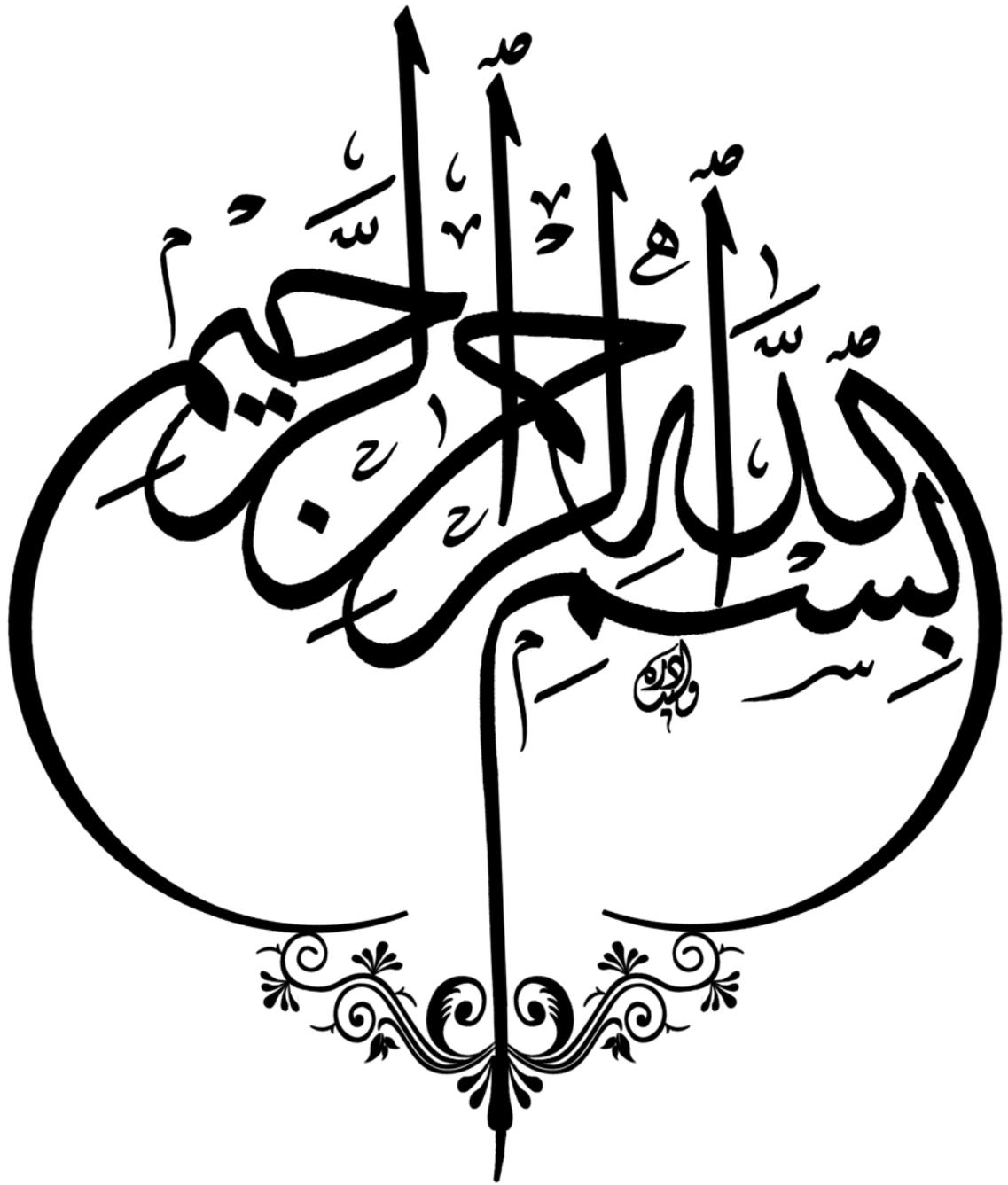
Jury d'évaluation :

Encadreur : MEGHNOUS Ouissem (MAB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : ABDELAZIZ Ouided (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : BOULAHROUF Khaled (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire
2021 - 2022





Remerciements

Remerciement et Louange à Dieu de nous avoir guidé et donné le courage et la volonté pour réaliser ce travail.

Nous adressons nos remerciements les plus sincères à notre chère encadrante Dr. **MEGHNOUS OUISSEM** qui a guidé, surveillé le déroulement et l'exécution de ce mémoire en nous prodiguant tout aide possible, encouragements continus, gentillesse et en nous consacrant beaucoup de son temps précieux. Nous étions très honorées de travailler avec vous.

Nous tenons à remercier l'ensemble des membres du jury qui nous font l'honneur en acceptant de juger ce travail. A Dr. **ABDELAZIZ OUIDED** Maître de conférences et Chef de département de « Microbiologie » à l'université Frères Mentouri Constantine 1, qu'elle trouve ici notre très profonde gratitude.

Nous voudrions exprimer également nos sincères reconnaissances à Dr. **BOULAHROUF KHALED** Maître de conférences à l'université Frères Mentouri Constantine1, pour ses précieux conseils et ses encouragements.

Nous présentons ici le témoignage de nos sincères gratitude pour Dr. **KASSALAOUAR MOUNIA** Maître de conférences classe B. Université Frères Mentouri. Constantine1 pour sa gentillesse, son amabilité et ses précieux conseils.

Nous tenons aussi à remercier l'ensemble des enseignants de la spécialité «MBF » pour avoir consacré leur temps et leur savoir-faire afin de nous faire bénéficier d'une meilleure Formation

Merci





Dédicaces

Je dédie ce travail

A ma famille, elle qui m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui :

Spécialement A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon adorable mère **SAOUDI NADIA**.

A mon précieux offre du dieu, qui doit ma viema réussite et tout mon respect: mon cher père **AISSA**.

À mon frères **OKBA** Pour ses soutiens moraux et leurs conseils précieux tout au long de mes études.

À ma chère Sœur **ARIDJ NOURHANE** et qui n'ont pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études.

À mon petit frères **RAID ABDESSALAM** mon bébé qui sait toujours comment Procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.

A la mémoire de mon oncle **SAOUDI BRAHIM** disparu trop tôt.

À ma grand-mère **MOUNI** , mes tantes **LEILA** et **NAIMA** et mes deux cousines **LINA KATER ENNADA** et **RAWNEK AMEL** .

Que Dieu les protège leur donneune longue et joyeuse vie et leurs offre la chance et le bonheur.

Merci d'être toujours là pour moi.

Hadil Nour El Yakine MOUALDI





Dédicaces

Je dédie ce travail tout d'abord

A ma source de bonheur et de joie, ceux qui se sont toujours sacrifiés pour me voir réussir : mes chères parents **Elhani** et **Nadia**. Aucun hommage ne pourrait être

A la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler

Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

Ames chers frères : **Walid** et **Islem Eddine**

A mes chères sœurs : **Manel** et **Rania**

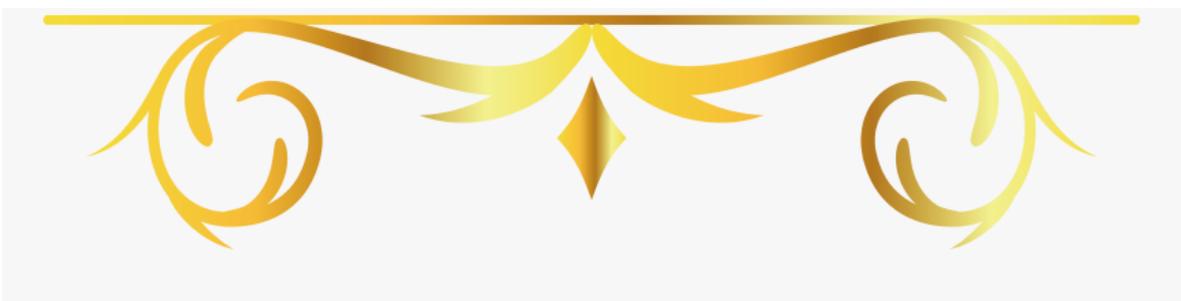
En signe d'amour, de reconnaissance et de gratitude pour le dévouement et les sacrifices dont vous avez fait toujours preuve à mon égard.

A mes très chers neveux : **Dakher**, **Gheit**, **Kinane** et l'adorable **Iyed** .

Dieu vous garde et vous bénisse

A tout ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible.

Salima DJERAFI





Dédicaces

À la personne la plus chère à mon cœur **Maman**, qui a sacrifié tout pour moi pour ma réussite, pardonneur, 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 mon cher **Papa** rien au monde ne vaut les efforts fournis pour mon éducation et mon bien être ; j'espère avoir répondu aux espoirs que tu as fondé en moi.

Que Dieu le tout puissant vous garde santé, bonheur et longue vie.

À mes chères amies du travail, tout en leur souhaitant la réussite dans tout ce qu'elles entreprennent.

Chaima AYAT



- **AMF** : Champignons Mycorhiziens à Arbuscules
- **BSA** : *Bovine serum albumin*
- **CAT**: Catalase
- **CE** : Conductivité Electrique
- **CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- **FAO** : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
- **h** : Heure
- **H₂O₂** : Peroxyde d'hydrogène
- **MNT** : Milieu non tamponné
- **MT** : Milieu tamponné
- **NaCl** : Chlorure de Sodium
- **NT** : Non tamponnée
- **PCR** : Réaction en chaîne par polymérase (de l'anglais *Polymerase Chain Reaction*)
- **PDA** : *Potato Dextrose Agar*
- **pH** : Potentiel Hydrogène
- **prot** : Protéines
- **PSE** : Pourcentage de Sodium Echangeable
- **PVP** : Polyvinylpyrrolidone
- **ROS** : Espèces Réactives de l'Oxygène
- **SOD** : Superoxyde Dismutase
- **T** : Tamponné
- **YPD** : *Yeast Peptone Dextrose*
- **Φ** : Diamètre

N°	Intitulé	P
1	Equilibre entre les ROS et le système antioxydant	7
2	Illustrations microscopiques de quelques champignons endophytes	12
3	Mécanisme de détoxification cellulaire	18
4	Courbe de croissance mycélienne d' <i>A. tubingensis</i> cultivée dans un gradient croissant de NaCl	29
5	Variations du poids total par rapport aux concentrations de NaCl	31
6	Teneur intracellulaire en H ₂ O ₂ chez <i>A. tubingensis</i> en MNT et MT	33
7	Activité spécifique de la catalase en fonction du % de NaCl dans le MNT et MT	34
8	Teneur en protéines totales en fonction du % de NaCl dans le MNT et MT	35

Liste des photographies

N°	Intitulé	P
1	Aspect macroscopique d' <i>Aspergillus tubingensis</i> cultivée sur milieu YPD	23
2	Aspect microscopique d' <i>Aspergillus tubingensis</i>	24
3	Mesure de diamètre de la croissance journalière des cultures d' <i>Aspergillus tubingensis</i>	28
4	Croissance mycélienne de la souche <i>A. tubingensis</i> après 144h.	29
5	Effet des différentes concentrations de NaCl sur la biomasse fongique récupérée du bouillon YPD non-tamponné.	30
6	Effet des différentes concentrations de NaCl sur la biomasse fongique récupérée du bouillon YPD tamponné	30

Liste des tableaux

N°	Intitulé	P
1	Types des sols salés	6
2	Variations du pH des milieux résiduels en fonction des concentrations en NaCl	32

L'objectif de ce travail consiste à mettre en évidence *in vitro* l'impact de la salinité sur le mycoendophyte *Aspergillus tubingensis* qui présentait une résistance aux fortes concentrations aux sels de métaux lourds, et d'évaluer la stimulation du système de défense antioxydant pour neutraliser les radicaux libres induits par la présence des doses élevées en chlorure de sodium (NaCl). *Aspergillus tubingensis* a montré une tolérance à l'excès de NaCl dans le milieu traduit par la bonne croissance même en doses élevées, notant une concentration minimale inhibitrice (CMI) à 20% de NaCl sur milieu YPD. L'hypersalinité a provoqué une augmentation significative de la teneur intracellulaire du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) avec sa teneur maximale 49.55mM. g⁻¹ ce qui a induit une réponse antioxydante traduite par des activités catalasiques importantes avec un maximum de 10.58μmol.min⁻¹.μg⁻¹prot. Ces résultats révèlent que la souche peut s'adapter à des concentrations élevées de NaCl, ce qui motive les biotechnologues à son utilisation comme bioremédiateur efficace pour développer une nouvelle stratégie de lutte contre la salinité des sols.

Mots-clés : mycoendophyte, *Aspergillus tubingensis*, salinité, NaCl, stress oxydatif, antioxydants, bioremédiation.

The aim of this study is to highlight *in vitro* the salinity impact on the mycoendophyte *Aspergillus tubingensis* which showed resistance to high concentrations of salt heavy metals, and to evaluate the stimulation of the antioxidant defence system to neutralize free radicals induced by the presence of high doses of sodium chloride (NaCl). *Aspergillus tubingensis* showed a tolerance to excess of NaCl in the culture medium reflected by the important growth even in high doses, noting a minimum inhibitory concentration (MIC) at 20% NaCl on YPD medium. Hypersalinity caused a significant increase in the intracellular content of hydrogen peroxide (H₂O₂) with a maximum content 49.55mM.g⁻¹ which induced an antioxidant response translated by important catalase activities with a maximum of 10.58μmol.min⁻¹.μg⁻¹ prot. These results reveal that the strain can adapt to high concentrations of NaCl, motivating biotechnologists to use it as an effective bioremediator to develop a new strategy for soil salinity control.

Keywords : mycoendophyte, *Aspergillus tubingensis*, salinity, NaCl, oxidative stress, antioxidants, bioremediation.

الهدف من هذا العمل هو تسليط الضوء مخبريا على تأثير الملوحة على الفطر الداخلي *Aspergillus tubingensis* الذي أظهر مقاومة للتركيزات العالية من أملاح المعادن الثقيلة، و تقييم تحفيز نظام الدفاع المضاد للأكسدة لتحديد الجذور الحرة (ROS) الناتجة عن وجود جرعات عالية من كلوريد الصوديوم NaCl. أظهر *Aspergillus tubingensis* تحمل زيادة جرعات NaCl في الوسط الغذائي الذي ينعكس على النمو الجيد حتى في الجرعات العالية، مع ملاحظة التركيز المثبط الأدنى (MIC) عند 20% NaCl في وسط YPD. تسبب فرط الملوحة في ارتفاع كبير في المحتوى الداخلي الخلوي لبيروكسيد الهيدروجين (H₂O₂) مع حد أقصى للمحتوى قدر ب 49.55mM. g⁻¹ الذي تسبب في تحفيز استجابة مضادات الأكسدة المترجمة بالحد الأقصى لنشاط الكاتالاز (CAT) المقدر ب 10.58μmol.min⁻¹.μg⁻¹prot. تكشف هذه النتائج أن السلالة يمكن أن تتكيف مع التركيزات العالية من NaCl، مما يحفز علماء التكنولوجيا الحيوية على استخدامها كوسيط حيوي فعال لتطوير استراتيجيات جديدة لمكافحة ملوحة التربة.

الكلمات المفتاحية : الفطريات الداخلية، *Aspergillus tubingensis*، الملوحة، NaCl، الإجهاد التأكسدي، مضادات الأكسدة، المعالجة الحيوية.

Remerciements

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des photographies

Liste des tableaux

Résumé

Abstract

الملخص

Table des matières

Introduction	1
Synthèse bibliographique	
1. Pollutions et contraintes environnementales.....	3
2. Sources des polluants du sol.....	3
2.1. Sources anthropiques.....	3
2.2. Sources naturelles et géogénique.....	3
2.3. Principaux polluants des sols.....	4
3. Salinité des sols.....	4
3.1. Généralités sur la salinité.....	4
3.2. Origine de salinisation des sols	4
3.2.1. Salinisation primaire	4
3.2.2. Salinisation secondaire.....	5
3.3. Norme de la salinité des sol.....	5
3.4. Notion de stress.....	6
3.5. Type de stress.....	6
3.5.1. Stress biotique.....	6
3.5.2. Stress abiotique.....	6
4. Salinité et stress oxydatif	6
4.1. Stress oxydatif.....	6
4.2. Stress salin.....	7
5. Impact du stress salin sur le sol.....	8

5.1. Impact du stress salin sur les champignons	8
5.2. Conséquences des ROS générés par la pollution en sel.....	9
6. Biotechnologie.....	9
6.1.Généralités	9
6.2. Biotechnologie en couleur.....	10
6.3. Potentialités biotechnologiques des mycoendophytes isolées à partir des environnements salins	10
6.4. Mycoremédiation.....	13
6.5. Rôle d' <i>Aspergillus tubingensis</i> en tant que bioremédiateur.....	15
7. Techniques de la mycoremédiation.....	16
7.1 Biodégradation.....	16
7.2. Bioabsorption.....	16
7.3. Bioconversion	16
8. Défenses antioxydantes	17
8.1. Antioxydants enzymatiques	18
8.1.1. Superoxyde dismutase "SOD"	18
8.1.2. Catalase"CAT"	18
8.1.3. Peroxydase "POD".....	19
8.1.4. Glutathion peroxydases "GPX".....	19
8.2. Antioxydants non enzymatiques	20
8.2.1. Proline.....	20
8.2.2. Vitamine E et Vitamine C.....	20
8.2.3. Glutathion"GSH".....	21

Matériel et méthodes

1. Objectif.....	22
2. Description du matériel biologique.....	22
3. Position systématique	24
4. Réactivation d'endophyte fongique	25
5. Test de tolérance.....	25
5.1. Sur milieu gélosé YPD.....	25

5.2. Sur bouillon YPD.....	25
6. Impact du stress oxydatif sur l'activité antioxydante	26
6.1. Mesure de la teneur intracellulaire en H ₂ O ₂	26
6.2. Dosage des activités enzymatiques antioxydantes.....	26
6.2.1. Préparation de l'extrait enzymatique	26
6.2.2. Dosage de la Catalase (CAT)	27
6.2.3. Dosage des protéines totales.....	27
Résultats et discussion	
1. Impact du stress salin sur la croissance.....	28
1.1. Sur milieu YPD gélosé.....	28
1.2. Sur milieu YPD bouillon tamponné et non tamponné.....	30
1.2.1 Estimation du poids total.....	30
1.2.2 Impact du stress salin sur la variation du pH du milieu résiduel.....	31
2. Impact du NaCl sur le stress oxydatif.....	32
2.1. Impact du NaCl sur la teneur intracellulaire en H ₂ O ₂	32
2.2. Impact du NaCl sur l'activité de la catalase.....	34
2.3. Impact du NaCl sur la teneur en protéines totales.....	35
Conclusion	40
Références bibliographiques	42
Annexes	



Introduction

La salinité affecte la plupart des terres, y compris l'Algérie (Hamdy, 1999). Après la sécheresse, la salinité des sols est le deuxième facteur responsable de la réduction de la croissance des cultures dans des zones arides et semi-arides. Une étude globale a révélé que de 1.5 milliard d'hectares cultivés 6% de ces sols sont devenus salins (Munns *et al.*, 1999).

Bien que la salinisation des sols soit essentiellement un phénomène naturel, la main de l'homme y reste l'exploitation et recours au développement des terres. Les activités minières et les industries lourdes telles que l'industrie pétrolière et l'industrie chimique ont contribué sérieusement à l'aggravation de la salinité du sol, la salinité est l'un des stress abiotiques, dû à la présence de sels hautement solubles dans le sol (Djilali et Daoud, 2000).

Les effets du stress salin peuvent aboutir à une détérioration des sols de manière irréparable, provoquant dans certains cas leur désertion et la réduction des surfaces cultivables de nombreuses régions (Mange *et al.*, 2009). Cette salinisation progressive aboutit à la formation de tannes des étendues sur salées où ne subsistent que certaines cultures plus ou moins tolérantes à la salinité, allant jusqu'à la disparition de nombreuses formes de vie et l'apparition de divers problèmes environnementaux (Gupta et Abrol, 1990).

En effet, des concentrations élevées en sel sont potentiellement inhibitrices de la croissance de nombreuses formes de vie notamment les microorganismes, cette salinité induit une surproduction d'espèces réactives oxygénées (ROS), considérée comme le principal mécanisme à l'origine de la cytotoxicité (Maugin *et al.*, 1996). En réponse aux ROS nuisibles, les microorganismes ont développé de multiples mécanismes de défenses par la synthèse des composés antioxydants enzymatiques tels que la catalase (Soufane *et al.*, 2018) et non enzymatiques, pour piéger ces ROS (Meghnous *et al.*, 2019).

Pour pallier ce problème environnemental, des méthodes physiques et chimiques ont été mises au point pour la restauration des sols affectés. Néanmoins, l'application de ces méthodes est onéreuse, inefficace et laisse en général les sols stériles. La bioremédiation est une alternative écologique la plus rentable et durable pour la désintoxication et l'élimination de nombreux polluants environnementaux, y compris les produits résultant des activités minières (Manga *et al.*, 2009 ; Agarry et Ogunleye, 2012).

Plusieurs stratégies de bioremédiation sont envisageables afin de limiter les effets délétères du NaCl sur le sol entre autres l'utilisation des mycoendophytes d'où l'appellation << la mycoremédiation >>.

Au cours des dernières années, les champignons endophytes ont reçu une attention considérable et sont considérés comme étant une source riche de nouveaux métabolites secondaires biologiquement actifs (Zhang *et al.*, 2006).

Aspergillus tubingensis est considéré parmi les champignons noirs endophytes que l'on peut isolés du sol ou des résidus de cultures agricoles, possédant une grande activité antioxydante et pouvant être utile dans plusieurs applications industrielles comme substitut d'antioxydant. Cette souche ne produit aucune mycotoxine en raison de l'absence de gène apparentés grâce au séquençage de son génome (Lopez De Leon *et al.*, 2019).

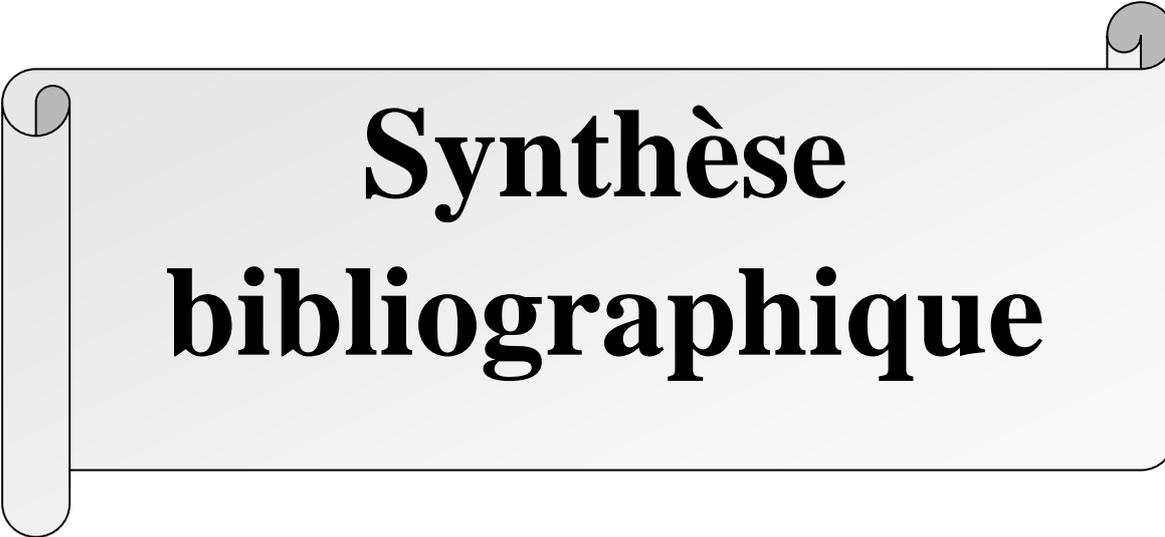
L'objectif de ce présent travail est d'étudier l'impact des concentrations graduelles de NaCl sur la croissance de l'endophyte *Aspergillus tubingensis* et sa réponse antioxydante au stress généré par la présence de NaCl dans le milieu.

Ce mémoire est scindé en deux parties ;

La première partie est consacrée à la description des données bibliographiques relatives aux concepts clés de ce travail.

La deuxième partie, est une description des protocoles expérimentaux utilisés pour répondre à l'objectif ciblé et à la discussion des résultats obtenus.

Nous terminerons notre travail par une conclusion générale et des perspectives.



Synthèse bibliographique

1. Pollutions et contraintes environnementales

Le sol est défini comme un corps naturel dynamique présent à la surface de la terre, composé de solides minéraux et organiques, de gaz, de liquides et d'organismes vivants qui occupent des parties de la surface de la terre capables de supporter la croissance des plantes et qui ont des propriétés résultant des effets intégrés du climat et des organismes vivants agissant sur le matériau parental (Brady *et al.*, 2008).

Le sol est un milieu vivant qui contient une flore, une faune et une microflore particulièrement riche, interagissant entre elles et avec les constituants du sol. Ainsi, la composition d'un sol dépend de nombreux facteurs abiotiques et biotiques (Baize et Jabiol, 2011).

Il est désormais largement reconnu que les sols sont essentiels au maintien de la qualité de l'environnement à l'échelle locale, régionale et mondiale. En raison de son effet majeur sur tous les écosystèmes, la contamination des sols entraîne des perturbations dans l'ensemble de l'écosystème de la planète. Il est donc évident de dire que la pollution des sols peut provoquer des perturbations dans l'ensemble de l'écosystème terrestre (Nagar *et al.*, 2021).

2. Sources des polluants du sol

2.1. Sources anthropiques

Principalement les émissions des usines productrices d'énergie qui comportent les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Les usines productrices d'énergie nucléaire émettent de la radioactivité, les émissions des véhicules et des avions comportent des oxydes de carbone, d'azote et de soufre, quelques métaux lourds et des micropolluants organiques, les déchets et les boues d'épurations, et les déchets d'origine industrielle (Mirsal, 2008).

2.2. Sources naturelles et géogéniques

Le sol peut être contaminé par des polluants naturels comme certains matériaux du sol agissant de métaux lourds, d'éléments inorganiques, de radionucléides. Par exemple les sources naturelles des métaux lourds comprennent les rejets volcaniques (Chen *et al.*, 2019) et les éléments des roches mères qui sont les principales sources de métaux lourds

dans le sol (Zhang et Wang, 2020), les catastrophes naturelles telles que les incendies de forêt et les éruptions volcaniques provoquent une pollution des sols avec la libération d'éléments toxiques dans l'environnement (Nagar *et al.*, 2021).

2.3. Principaux polluants des sols

Il existe une grande variété de composés susceptibles de contaminer les sols, allant de simples ions inorganiques à des molécules organiques complexes :

- **Composés inorganiques** : principalement les métaux lourds comme le plomb, le mercure, le cadmium, le chrome ou le nickel et les anions de polarité négative comme les chlorures, les phosphates, les nitrates, les nitrites, les cyanures, et les sulfates, etc.
- **Composés organiques** : selon la Santé publique France (2019), ces composés sont principalement introduits par l'homme notamment les hydrocarbures détectés dans 40% des sites diagnostiqués dans la base de données BASOL (hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), solvants halogénés comme le trichloréthylène par exemple, composés organiques volatiles (COV), etc.).

3. Salinité des sols

3.1. Généralités sur la salinité

La salinité est définie par Faye *et al.* (2021) étant un enrichissement des sols par les sels solubles et acquiert le caractère salé et par conséquent l'accumulation anormale de sels dans le profil du sol peut affecter ses capacités agronomiques en provoquant un stress.

La salinisation des terres est considérée comme un problème mondial. Selon la FAO et les estimations les plus récentes, la salinisation affecte plus de 400 millions d'hectares, dans l'ensemble il n'y a qu'un milliard et demi d'hectares cultivables sur la terre (Legros, 2009).

3.2. Origines de salinisation des sols

La salinisation des sols se divise en primaire et secondaire :

3.2.1 Salinisation primaire

Selon Montoroi (2017) la salinisation primaire comporte les facteurs naturels qui génèrent des sels solubles dans les terres, à partir de l'altération et dissolution des minéraux contenus dans les sols et les roches, sources géothermales, érosion éolienne,

nécrose des êtres vivants, qui seront transporté par les pluies, les rivières, les eaux souterraines, les eaux de mer, les vents et les accumulent dans les sols (climats secs, sécheresses temporaires, proximité de la mer dans les zones côtières et deltaïques, présence d'une nappe salée peu profonde, dépôts éoliens (embruns, aérosols), zones endoréiques (Sebkhas, Chotts)).

3.2.2 Salinisation secondaire

La salinisation secondaire est produite par l'activité humaine, associée aux activités agricoles et notamment à l'irrigation. Une des conséquences de cette dernière est la perte du rendement des sols car la forte concentration de sel dans les sols empêche la bonne production, de sorte que les sols arables affectés par le NaCl perdent progressivement leur fertilité (Ghamnia, 2014).

3.3. Norme de la salinité des sols

Il est impératif de comprendre la différence entre un sol normal et un sol salin.

- **Sol normal** : avec un pourcentage de sodium échangeable (ESP) inférieur à 15.0, un pH compris entre 6.5 et 8.5, une conductivité électrique (CE) inférieure à 4.0 dS m⁻¹ et une proportion égale d'anions et de cations (Srivastava, 2019).

- **Sol salin** : avec une conductivité électrique (EC) supérieure à 4 dS. m⁻¹, un pH inférieur à 8, et un pourcentage de sodium échangeable Pourcentage (ESP) inférieur 15 (Mindari, 2015), un rapport d'adsorption du sodium (SAR) inférieur à 13.0 (à 25 C) (Srivastava, 2019).

D'après Maillard (2001), selon la conductivité de l'extrait de sol saturé 6 types de sols ont été distingués :

Tableau 1 : Types des sols salés (Maillard, 2001)

Classe	Conductivité de l'extrait de sol saturé (dS/m)
Non salins	0 – 2
Légèrement salins	2 – 4
Modérément salins	4 – 8
Fortement salins	8 – 16
Très fortement salins	> 16

3.4. Notion de stress

Le mot stress a été décrit par Detruit *et al.* (1994) comme un désordre observé chez un organisme, ou encore un écart significatif vis-à-vis des conditions de vie optimales par suite à ses conséquences fonctionnelles ou structurelles à la fois au niveau moléculaire cellulaire individuel. Alors que Barouki (1999) a défini le stress au niveau cellulaire étant un changement critique et chronique des paramètres ordinaires de l'environnement cellulaire.

3.5. Types de stress

Le stress peut provenir de deux sources distinctes, à savoir :

3.5.1. Stress biotique

Le stress biotique représente l'ensemble des paramètres physico-chimiques ou biologiques, qui résultent de l'existence de l'activité des organismes vivants. Ainsi, les facteurs biologiques caractérisant toutes les influences que les organismes exercent les uns sur les autres et sur leur environnement (Benabderahmane, 2021).

3.5.2. Stress abiotique

Les stress abiotiques sont causés par des facteurs environnementaux tels que la sécheresse, les UV, le niveau élevé ou bas de sel (Robert-Seilaniantz, 2010).

4. Salinité et stress oxydatif

4.1. Stress oxydatif

En terme écologique le stress oxydatif est induit par une variété de stressés abiotiques tel que la sécheresse, le sel, les températures extrêmes... (Baltruschat *et al.*, 2008), il se produit lorsque l'équilibre entre la production des radicaux libres et leur neutralisation est rompue (figure 1) (Migdal et Serres, 2011), favorisant ainsi la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Bosoi et Rose, 2012).

Les ROS peuvent avoir des effets néfastes sur les cellules en oxydant les lipides, les protéines, l'ADN et les glucides, entraînant des maladies et la mort (Toledano *et al.*, 2004).

Les radicaux libres (l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^-) sont des sous produits normaux des cellules qui respirent et sont également produits par un large éventail de produits chimiques environnementaux différents. Il est donc essentiel pour les organismes aérobies de moduler les niveaux et les activités des ROS afin de se protéger contre la toxicité (Navarrete *et al.*, 2009).

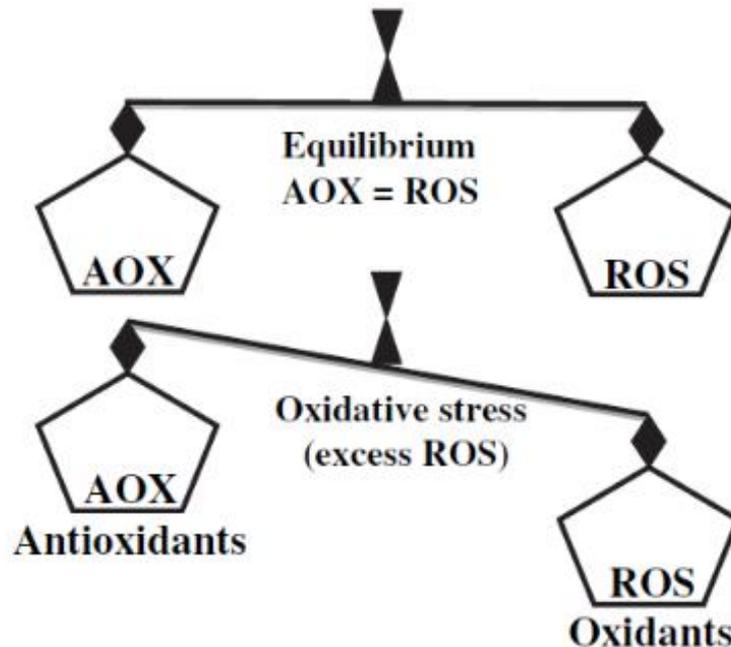


Figure 1 : Equilibre entre les ROS et le système antioxydant (Migdal et Serres, 2011)

4.2. Stress salin

Défini comme une concentration excessive en sel. Le terme stress salin s'applique surtout à un excès des ions, en particulier Na^+ et Cl^- (Hopkins, 2003). Le plus souvent, le stress salin est causé par de fortes concentrations de Na^+ et de Cl^- dans la solution du sol. L'irrigation et la remontée des nappes phréatiques sont aussi des causes de la salinité (Kouadria, 2018).

Le stress salin peut entraîner des changements importants dans la structure des communautés microbiennes du sol, les processus métaboliques et les microenvironnements qui les entourent (Wang *et al.*, 2021)

5. Impact de la salinisation sur le sol

La salinité a une grande influence sur les propriétés physiques du sol, elle cause la floculation qui est un processus liant les particules fines de sol en agrégats. Le calcium et le magnésium empêchent le sol de s'agglomérer, tandis qu'une teneur élevée en sodium provoque la dispersion du sol (Ait El Mokhtar, 2020).

La salinité transforme le sol en un matériau dur semblable à du ciment, ce qui entraîne une faible perméabilité avec une conductivité hydraulique (CH) réduite et le développement d'une croûte de surface (Abu-Sharar *et al.*, 1987).

De plus, l'augmentation de la salinité de sol affecte négativement l'activité microbienne (Mavi *et al.*, 2012), et provoque aussi l'augmentation de la concentration de cadmium, de métal, de chlorure soluble, de sulfate et de bicarbonate, ce qui affecte négativement la composition du sol, tandis que la concentration des ions magnésium et calcium diminue dans le sol (Srivastava *et al.*, 2019).

5.1. Impact du stress salin sur les champignons

La croissance fongique est affectée par de nombreux facteurs environnementaux tels que la salinité (Deacon, 2005). D'ailleurs selon Abdel-Azeem *et al.* (2016) les champignons du genre *Aspergillus* sont parmi les meilleures espèces tolérantes au sel.

Le champignon *Aspergillus niger* est l'un des champignons les plus répandus car il a la capacité de former un grand nombre de spores. De plus, certaines de ses espèces ont un

stade sexuel et des corps pierreux qui sont plus résistants aux changements environnementaux inappropriés (Waheed *et al.*, 2019).

La salinité affecte négativement la croissance du mycélium en réduisant la disponibilité des hydrates de carbone pour la croissance des hyphes et du mycélium (Asghari *et al.*, 2008) et cause aussi une diminution de germination des spores fongiques dans le sol (Hameed *et al.*, 2014).

Les champignons ont une répartition très vaste dans divers environnements, en raison de leur sécrétion de plusieurs enzymes qui leur permettent d'exploiter différentes sources de nourriture et de supporter diverses conditions environnementales (Waheed *et al.*, 2019).

5.2. Conséquences des ROS générés par l'hypersalinité

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des molécules chimiquement réactives contenant de l'oxygène telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH^\cdot), l'ion superoxyde (O_2^-) (Bosoi et Rose, 2012).

Elles sont formées en tant que sous-produit naturel du métabolisme normal de l'oxygène. Cependant, les niveaux de ROS peuvent augmenter en présence de métaux redox-actifs (Fe, Mg) ou même de métaux redox-inactifs (Cd, Pb) (Khouja, 2011), et aussi en présence du sel.

En plus, dans le cas d'un stress oxydatif le H_2O_2 peut également être converti en radicaux hydroxyle par la réaction de Fenton provoquant une peroxydation lipidique, une protéolyse et des dommages de l'ADN. Ces radicaux interagissent avec les acides gras polyinsaturés et induisent une peroxydation membranaire lipidique (Ben-Yahmed, 2013).

Le peroxyde d'hydrogène peut également être métabolisé directement par le glutathion peroxydase et par la catalase (CAT) pour donner de H_2O et O_2 réduisant ainsi les niveaux de peroxyde d'hydrogène intracellulaire (Gratao *et al.*, 2005).

Pour se protéger des effets toxiques de l'oxygène, l'organisme a développé des systèmes de défense antioxydants composés d'enzymes (ex. Catalase), de vitamines (A, C, E), d'oligoéléments (ex. le sélénium), de protéines (ex. la ferritine). En situation

physiologique, ces systèmes antioxydants ont la capacité de réguler parfaitement la production des ROS (Pincemail *et al.*, 2002).

6. Biotechnologie

6.1. Généralités

Le terme « **biotechnologie** » remonte à 1919, lorsqu'il a été créé pour la première fois par l'ingénieur hongrois Karl Erkey (Bud, 1989). À cette époque, la biotechnologie incluant l'utilisation d'organismes vivants pour la production de nouveaux produits à partir de matières premières d'origine biologique. D'où le nom consistant en une combinaison des mots grecs : *bios*– vie ; *techno* technique ; et *logos* - étude. Dès lors, le concept de la biotechnologie a été corrigé à plusieurs reprises (Kennedy *et al.*, 1992), mais la définition la plus largement acceptée a été donnée par OCDE en 1981 par Bull *et al.* (1982) comme étant : « **L'application de principes scientifiques et techniques au traitement des matériaux par des agents biologiques** ».

6.2. Biotechnologie en couleur

La société mondiale est confrontée à des défis croissants dans les soins de santé, l'énergie et la production alimentaire. Avec l'augmentation régulière des besoins en soin et en énergie, le monde a donc réagi en développant différentes solutions pour relever ces défis grâce au développement et aux avancées de la biotechnologie et à ce jour (Abdin, 2007).

Les biotechnologies sont nombreuses. Elles sont de plus en plus courantes de les définir par cinq couleurs :

Les biotechnologies blanches consistent en l'emploi de systèmes biologiques (bactéries) pour la fabrication, la transformation ou la dégradation de molécules grâce à des procédés enzymatiques ou de fermentation dans un but industriel. Les biotechnologies jaunes concernent l'environnement (biodépollution, bioremédiation, phytoremédiation...). Les biotechnologies rouges concernent la santé humaine (biomédecine) et animale, la production de médicaments issus d'organismes vivants ou de leurs composants cellulaires. Les biotechnologies bleues concernent la vie marine dont la valorisation des matières

premières (agarose, alginates, chitine, chitosane, ...). Les biotechnologies vertes concernent la valorisation des productions agricoles (Besri, 2009).

6.3. Potentialités biotechnologiques des mycoendophytes isolées à partir des environnements salins

La biotechnologie fongique est un participant de l'industrie mondiale en raison de son potentiel étourdissant. Les champignons jouent un rôle important dans la résolution des grands défis mondiaux. L'utilisation de procédés et de produits fongiques peut renforcer le développement durable à partir d'une utilisation plus efficace des ressources naturelles (Leera *et al.*, 2019).

Les champignons ont été exploités pour produire une gamme de produits de valeur, dont certains se sont avérés inestimables pour l'humanité. Depuis les temps anciens, les champignons ont été utilisés pour la transformation simple des aliments (Dhingra *et al.*, 2001).

Au cours des dernières décennies, l'utilisation de souches fongiques à des fins biotechnologiques a été largement étudiée pour la production ultérieure de produits de valeur ou dans la résolution des problèmes d'ordre environnemental (Dhingra *et al.*, 2001).

Les champignons sont utilisés dans de nombreux procédés industriels de fermentation, grâce à leur équipement enzymatique qui les rend très importants pour l'homme qui valorise ces organismes dans des domaines très variés : biodépollution, recyclage (matières plastiques, colorants industriels, pesticides, toxines, métaux lourds, hydrocarbures...), production industrielle.

Cette dernière renferme : biocatalyse de polymères, blanchiment non polluant de la pâte à papier, production de biocarburants, produits alimentaires comme les arômes, une source de nourriture dans la préparation du pain et de jus fermentés (*Saccharomyces crevisiae*) (Leera *et al.*, 2019), métabolites primaires ou secondaires et médicaments (Zhang *et al.*, 2015).

Ils possèdent aussi des activités antimicrobiennes, ils sont utilisés comme des biofertilisants. Des exemples courants de champignons sont *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.*, *Fusarium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Aspergillus sp.* et *Trichoderma sp.*

Les champignons sont les micro-organismes les plus fréquemment isolés en tant qu'endophytes, ils peuvent croître de façon intra et/ou intercellulaire dans les tissus internes des plantes, sous l'assise des cellules épidermiques (Figure2) (Yates *et al.*, 1997 Strobel *et al.*, 1999; Moon *et al.*, 2002).

Leurs présences dans les tissus internes de la plante d'une manière asymptomatique laissent supposer que leurs relations avec l'hôte étaient d'ordre symbiotique mais leur biodiversité suggère qu'ils peuvent être également des saprophytes (Meenatchi *et al.*, 2016).

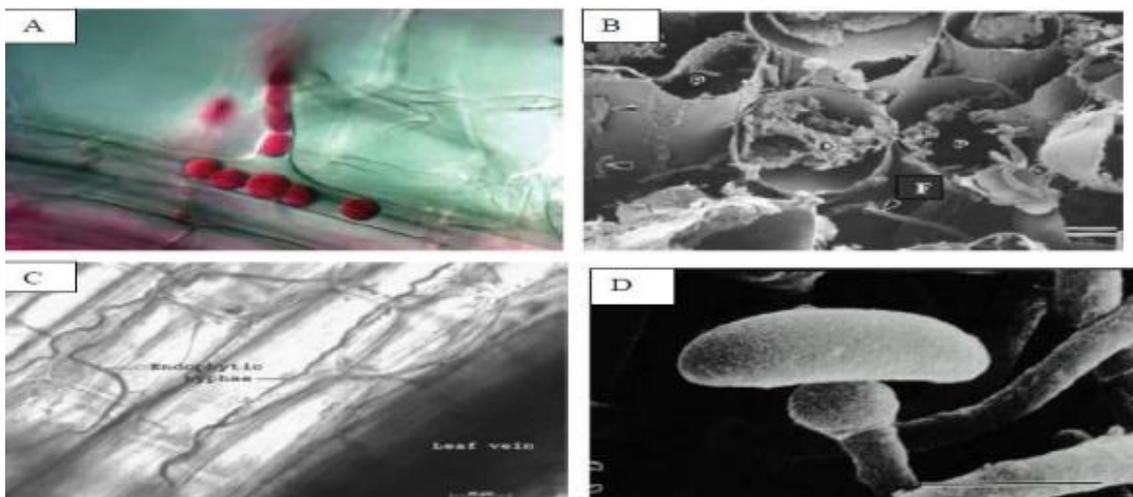


Figure2 : Illustrations microscopiques de quelques champignons endophytes

A : colonisation de *Piriformospora indica* des racines de l'orge **B** : *Fusarium moliniforme* endophyte infectant des cellules radiculaires du Maïs. **C** : Hyphe de l'endophyte *Neotyphodium lolii* dans la feuille de ray-grass. **D** : Conidie de *Neotyphodium sp.* Isolé à partir de fêtuque.(Yates *et al.*, 1997 Strobel *et al.*, 1999; Moon *et al.*, 2002).

Des études de Brandrett (2006) indiquent que les champignons endophytes contribuent de manière significative à l'adaptation des plantes face à des conditions de stress environnementaux à savoir le stress salin).

Le champignon endophyte de l'orge *Piriformospora indica* élimine les effets du stress salin chez sa plante hôte par l'augmentation de l'activité métabolique dans les feuilles, l'induction de changements dans la composition des acides gras dans les feuilles, la régulation positive de l'activité des enzymes antioxydantes (Baltruschat *et al.*, 2008),

l'augmentation de la biomasse (Waller *et al.*, 2005) et l'induction de la biosynthèse de l'éthylène dans les racines d'orge (Cao *et al.*, 2006).

Les résultats de Begheri *et al.* (2013) ont révélé aussi des effets significatifs de *Piriformospora indica* sur les activités des enzymes antioxydantes en présence de plusieurs concentrations de NaCl chez *Aryza sativa* (riz). L'activité de la catalase des pousses et des racines inoculées avec *Piriformospora indica* a augmenté avec l'augmentation de NaCl jusqu'à 200mM.

Le champignon endophyte du concombre *Paecilomyces formosus* LHL10 améliore la croissance et la tolérance de sa plante hôte à la salinité par l'accumulation de la proline et des antioxydants (Khan *et al.*, 2012).

De la même manière, les champignons endophytes *Phoma glomerata* LWL2 et *Penicillium sp.* LWL3 augmentent également la biomasse et améliorent l'assimilation des éléments nutritifs essentiels du concombre dans des conditions du stress salin (Waqas *et al.*, 2012). Il a été signalé aussi que le champignon endophyte du concombre *Exophiala sp.* LHL08 contribue dans la tolérance de la salinité par l'augmentation de la teneur en acide salicylique (Khan *et al.*, 2011).

Les plantes d'haricot *Mungo* associés à *Aspergillus awamori*, présentent une faible accumulation des biomarqueurs du stress et de Cl, Na, K, Ca, alors que leurs concentrations étaient plus élevées dans sa plante hôte. Cette association agit contre le stress salin par une réduction significative de la peroxydation lipidique, une diminution significative de l'Ascorbate peroxyde et une augmentation de l'activité de la catalase (Riad *etal.*, 2021).

En plus, le champignon endophyte *Penicillium minioluteum* LHL09 et *Penicillium funiculosum* LHL06 isolés à partir de la *Glycine max. L.* (soja) améliorent la croissance de leurs plante hôte en régulant la biosynthèse des hormones et des flavonoïdes (Khan *et al.*, 2011).

L'association symbiotique plante hôte-endophyte agit contre le stress salin par la régulation de l'activité du glutathion, la catalase, la peroxydase, le polyphénol oxydase et

l'acide abscissique, la modification de l'acide jasmonique, et l'augmentation de la teneur en acide salicylique (Waqas *et al.*, 2012).

6.4. Mycoremédiation

Toute substance introduite dans l'environnement en quantité anormale est considérée comme un polluant. Un excès des polluants engendrant des effets délétères sur la faune et la flore conduisant à la pollution des écosystèmes.

D'après les travaux de Bourceret *et al.* (2016) le sol est soumis en permanence à des perturbations qui vont impacter la structure de ses communautés microbiennes et donc leur évolution dans le temps. La richesse et la diversité des espèces bactériennes et fongiques dans des sols historiquement pollués ont été augmentées en fonctions du temps, suggérant une adaptation des populations microbiennes à cette pollution au cours des décennies écoulées.

La mycoremédiation est une forme de technologie d'élimination biologique ; les avantages principaux des champignons par rapport aux bactéries sont leur capacité à se propager dans les sols grâce à leur mycélium et à produire des enzymes extracellulaires par exemple des oxydases à large spécificité de substrats qui permettent un meilleur contact avec les contaminants organiques du sol (Young et Cerniglia, 1995).

Pour réussir la mycoremédiation, il est essentiel de maximiser les conditions de croissance du champignon afin de produire suffisamment les enzymes ciblées (Johnsen *et al.*, 2005).

L'utilisation des champignons comme agents de bioremédiation « mycoremédiation » est désormais bien établie dans tous les écosystèmes et l'un des domaines les plus complexes de l'ingénierie de dépollution, dans ce domaine il existe deux techniques principales : la biostimulation qui consiste à stimuler l'activité des microorganismes autochtones et la bioaugmentation par l'introduire des microorganismes allochtones sélectionnés (Mougin *et al.*, 1996 ; Goltapeh *et al.*, 2013).

Parmi les méthodes de réhabilitation des sols contaminés par les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HPA), la bioremédiation par *Fusarium solani*, un champignon

imparfait ou Deutéromycète, capable de dégrader efficacement une large gamme d'HPA (Verdin *et al.*, 2004).

La toxicité de l'environnement induit au sein des communautés microbiennes la sélection de populations capables de survivre (tolérance aux pollutions), voir potentiellement capables de transformer les pollutions organiques (Yang *et al.*, 2014).

Garrido Hoyos *et al.* (2002) ont obtenu que la bioremédiation par *Aspergillus terreus* permet une dégradation de 65,77 % de DCO (Demande Chimique en Oxygène) des margines traitées en aérobiose. Par contre, *Funalia troggi* permet d'éliminer 70% de la DCO et 93 % des phénols, alors que *Coriolus versicolor* permet une réduction de 63 % de la DCO et 90 % des phénols.

Les résultats de Laib *et al.* (2022) montrent que l'extrait du champignon endophyte d'*Aspergillus niger* isolé à partir des feuilles du ricin commun *Ricinus communis* L. constitue une source de métabolites secondaires volatiles et non-volatiles à activité insecticide et peut être utilisé comme agent de lutte biologique contre un bon nombre d'insectes ravageurs et pathogènes comme le criquet migrateur *Locusta migratoria* L. (*Oedipodinae, Acrididae*).

6.5. Rôle d'*Aspergillus tubingensis* en tant que bioremédiateur

Aspergillus tubingensis est une espèce intéressante qui peut produire diverses enzymes spécialisées à haute valeur économique, agronomique et médicale.

Le champignon *Aspergillus tubingensis* est utilisé pour la biodégradation du plastique. Il décompose le plastique non biodégradable en quelques semaines, en sécrétant des enzymes qui séparent les molécules individuelles. Cette espèce fongique, a été découverte sur des échantillons de sol recueillis sur un lieu d'enfouissement d'ordures au Pakistan (Chongwang, 2017).

Dans les travaux de Meghnous *et al.* (2019) *Aspergillus tubingensis* a montré qu'il accumule et tolère de manière significative des doses importantes de Sb dans sa biomasse et que cet endophyte a présenté une réponse antioxydante importante, ces auteurs ont suggéré qu'*Aspergillus tubingensis* pourrait être un agent potentiel de la bioremédiation pour les sols contaminés par les sels de métaux lourds.

Les résultats obtenus par Ponniah *et al.* (2021) ont conclu aussi que *A. tubingensis* est classée parmi les plus éminentes espèces fongiques autochtones tolérantes et absorbantes de métaux provenant de la décharge d'une mine de bauxite. Cette souche avait le potentiel d'absorber une concentration élevée de Cr (VI). Le métal adsorbé était séquestré dans le mycélium du champignon sous une forme précipitée, ce qui a été confirmé par des analyses au microscope électronique à balayage (MEB) et aux rayons X à dispersion d'énergie (EDX).

L'influence d'*Aspergillus tubingensis* a été étudiée sur l'établissement de la végétation sur des résidus de bauxite et ses effets sur la colonisation fongique mycorhizienne à arbuscules (AMF) indigène.

Un bermudagrass (*Cynodondactylon*) tolérant aux alcalis et adapté aux conditions locales a été cultivé dans des résidus de bauxite avec différents amendements avec et sans *A. tubingensis*.

Les amendements de résidus de bauxite ont eu un effet positif sur la croissance du bermudagrass, en particulier lorsqu'ils étaient amendés avec du gypse et de la boue. Les traitements amendés avec du gypse et de la boue et inoculés avec *A. tubingensis* présentaient une biomasse aérienne et une absorption des nutriments maximales, et une accumulation réduite des métaux. La colonisation par les AMF indigènes a également augmenté grâce à l'inoculation par *A. tubingensis*.

Les résultats de cette étude suggèrent que *A. tubingensis* a le potentiel d'améliorer l'établissement de la végétation et la neutralisation des résidus de bauxite, en particulier lorsqu'il est amendé avec du gypse et des boues. (Giridhar et Sudhakara, 2011).

7. Techniques de la mycoremédiation

Les champignons impliquent plusieurs stratégies pour la remédiation des sites contaminés, généralement on a trois principales stratégies :

7.1. Biodégradation

Les microorganismes trouvent des sources de carbone et d'énergie dans les polluants qui leur permettent de se développer, il s'agit de la conversion des polluants en métabolites, biomasse et dioxyde de carbone (Mougin *et al.*, 1996).

7.2. Bioabsorption

Une procédure basée sur l'absorption des ions métalliques/ contaminants/ xénobiotiques » par biomasse vivante ou sèche (Hakeem *et al.*, 2020).

7.3. Bioconversion

La conversion des polluants industriels/agro-industriels en d'autres formes bénéfiques par des enzymes généralement lignolytiques (Hakeem *et al.*, 2020).

8. Défenses antioxydantes

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes afin d'assurer un stade non cytotoxique tout en contrôlant leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène (Figure 03) (Buchanan, 2000).

La nature des systèmes antioxydants varie selon les tissus et les types cellulaires, aussi selon le milieu extracellulaire ou intracellulaire (Boubali, 2017)

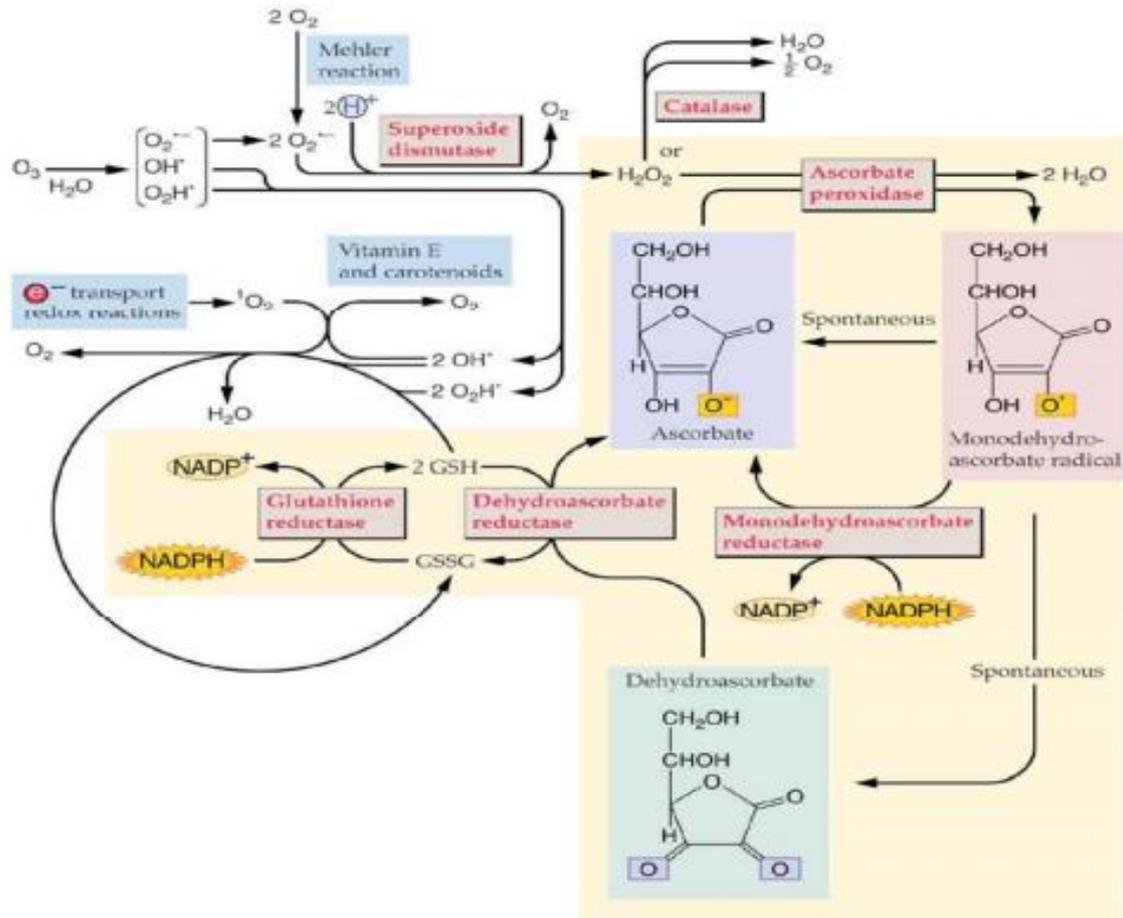


Figure 3: Mécanisme de détoxification cellulaire (Buchanan, 2000).

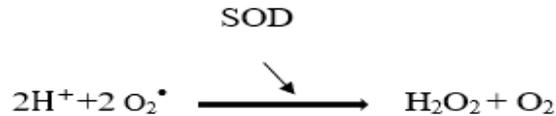
Les antioxydants sont des molécules chimiques capable d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables, interagir avec les radicaux libres, en piégeant directement les ROS générés afin de diminuer les stress oxydants dans l'organisme vivant et d'en maîtriser les effets délétères.

Selon le mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories : enzymatiques et non enzymatiques (Desmier, 2016 ; Soufane *et al.*, 2018)

8.1. Antioxydants enzymatiques

8.1.1. Superoxyde dismutase "SOD"

Les SOD [EC 1.15.1.1] sont les premières enzymes entrant dans la cascade des ROS. Ce sont des métallo-enzymes qui jouent un rôle important dans la défense antioxydante. Ils ont la capacité d'éliminer l'anion superoxyde produit en le dismutant en H₂O₂ et O₂ (voire la réaction) (Hocine et Gorine, 2017 ; Saida, 2017).



Les SOD sont classées en trois isozymes en fonction de l'ion métallique qu'elles fixent: Mn-SOD (localisée dans les mitochondries), Fe-SOD (localisée dans les chloroplastes), et Cu/Zn-SOD (localisée dans le cytosol, les peroxysomes et les chloroplastes) (Desmier, 2016).

8.1.2. Catalase "CAT"

La catalase [EC 1.11.1.6] est un enzyme tétramère contenant quatre groupes de porphyrine à hème (fer) qui lui permettent de réagir avec le peroxyde d'hydrogène, une molécule de catalase peut convertir des millions de molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène chaque seconde. Son pH optimal varie entre 6.8 et 7.5 et sa température de 45°C (Gaetani *et al.*, 1996).

Cette enzyme se trouve principalement dans les peroxysomes, commune presque dans tous les organismes vivants exposés à l'oxygène (Switala et Loewen, 2002). La catalase joue un rôle primordial dans la protection de la cellule contre les dommages oxydatifs par des ROS et possède l'un des nombres les plus élevés de turnover de toutes les enzymes (Putnam *et al.*, 2000).

Au niveau cellulaire la catalase peut convertir rapidement le peroxyde d'hydrogène, un sous-produit nocif de nombreux processus métaboliques en d'autres substances moins dangereuses afin d'éviter d'endommager les cellules et les tissus (Aébi H, 1984).

8.1.3. Peroxydase "POD"

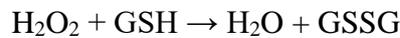
Les peroxydases [EC 1.11.1.7] est une hémoprotéine contenant habituellement de la ferriprotoporphyrine IX en tant que groupement prosthétique. Les POD oxydent plusieurs substrats en présence de peroxyde d'hydrogène (Penel *et al.*, 1991 ; Vianello *et al.*, 1997), tels que les composés phénoliques et les précurseurs de lignine (voire équation) (Halušková *et al.*, 2009).



La POD intervient dans plusieurs processus physiologiques : la lignification et la synthèse de la paroi cellulaire, le catabolisme des auxines et la défense contre le stress environnemental (Halušková *et al.*, 2009). La détoxification des sels des métaux se fait aussi par deux enzymes ; la glutathion S-transférase (GST) et la phytochélatine synthase (PCS) (Benhamdi, 2014).

8.1.4. Glutathion peroxydases "GPX"

La glutathion peroxydase [EC 1.11.1.9] est une autre enzyme de défense constituée la principale voie de dégradation des hydroperoxydes (Dobashi *et al.*, 2001).



C'est une enzyme à sélénium constituée de quatre sous unités identiques chacune contient un seul résidu sélénio-cystéine (Se-Cys) identique, ce qui est essentiel pour l'activité enzymatique (Krim, 2014).

Elle se retrouve dans les liquides extracellulaires ainsi que dans les cellules, au sein du cytosol et des mitochondries (Bouguerne, 2012).

8.2. Antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux antioxydants enzymatiques, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation.

8.2.1. Proline

La proline est un acide aminé protéinogène, considérée comme un antioxydant non enzymatique accumulée en réponse au phénomène couramment observé pour agir contre les ROS formés lors d'un stress environnemental (Chakraborty *et al.*, 2014 ; Rejeb *et al.*, 2012).

La proline est synthétisée à partir de l'acide glutamique comme substrat, *via* un intermédiaire pyrroline 5-carboxylate (P5C). Selon Benyahmed (2013), 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

8.2.2. Vitamine E et Vitamine C

Les vitamines E (α -tocophérol) et C (acide ascorbique) sont également considérées comme des antioxydants efficaces dans les cellules pour lutter contre le stress oxydatif (Evans, 2000).

La vitamine E (Tocophérols) est un antioxydant membranaire liposoluble, elle agit directement sur une variété de ROS, et plus particulièrement dans l'inhibition de la peroxydation lipidique (Gill et Tuteja, 2010). Également, elle peut augmenter l'activité de la SOD et de la CAT (Margaritis *et al.*, 2003).

La vitamine C (acide ascorbique) est un cofacteur essentiel à de nombreuses réactions enzymatiques, un antioxydant hydrosoluble existe sous sa forme anionique (AH^-) à pH physiologique, présente dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire.

Elle limite la peroxydation des lipides et renforce les défenses naturelles de l'organisme par le piégeage de $l'O_2^{\circ}$ et $l'OH^{\circ}$ et la réduction de radicaux α -tocophérol pour obtenir une très bonne efficacité de la vitamine E (Garait, 2006). Elle n'est pas synthétisée par les organismes (Boudebouda *et al.*, 2013).

8.2.3. Glutathion "GSH"

GSH (γ -L-glutamyl-L-cystéinyl-glycine : GSH) est une molécule considérée comme un antioxydant non enzymatique important dont ses fonctions principales sont liées à leur rôle dans la régulation redox dans les cellules (Pocsi *et al.*, 2004).

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



Matériel et méthodes

1. Objectif

Le présent travail a pour objectif de mettre en évidence les mécanismes de tolérance antioxydants d'*Aspergillus tubingensis* à des conditions du stress abiotique.

La souche *Aspergillus tubingensis* a été testée *in vitro* en présence du stress salin à différentes concentrations (0%, 5%, 10%, 15%, 20%) de NaCl, afin d'étudier l'effet des doses croissantes en NaCl sur la croissance, et les biomarqueurs antioxydants enzymatiques (catalase) et non enzymatiques (teneur en peroxyde d'hydrogène H₂O₂) d'*Aspergillus tubingensis*.

2. Description du matériel biologique

Cette étude porte sur l'endophyte fongique *Aspergillus tubingensis*, cette souche teste provient de la collection du laboratoire de Biologie et Environnement de l'Université des frères Mentouri Constantine1. Elle a été isolée à partir des racines d'une plante steppique hyperaccumulatrice de sels de métaux lourds, *Hedysarum pallidum* Desf. qui pousse sur des déblais miniers de la région Ain Babouche de la Willaya d'Oum Elbouaghi (Meghnous *et al.*, 2019).

Cette plante *Hedysarum pallidum* constitue un habitat pour un groupe diversifié de mycoendophytes à savoir, *Aspergillus tubingensis*. Des travaux antérieurs ont suggéré que cette souche est impliquée dans la tolérance de l'hôte végétal à tout stress environnemental (Khan *et al.*, 2017).

Aspergillus tubingensis est un *Aspergillus* noir appartenant à la section *Aspergillus nigri* et ressemble morphologiquement à *Aspergillus niger*. Il a été découvert pour la première fois par Raoul Mosseray en 1934.

Selon Mirhendi *et al.* (2016) les deux souches possédaient des caractéristiques microscopiques très similaires, telles que des conidies globulaires brunes foncées et épineuses, des vésicules sphériques et des hyphes légèrement pigmentées près de l'apex.

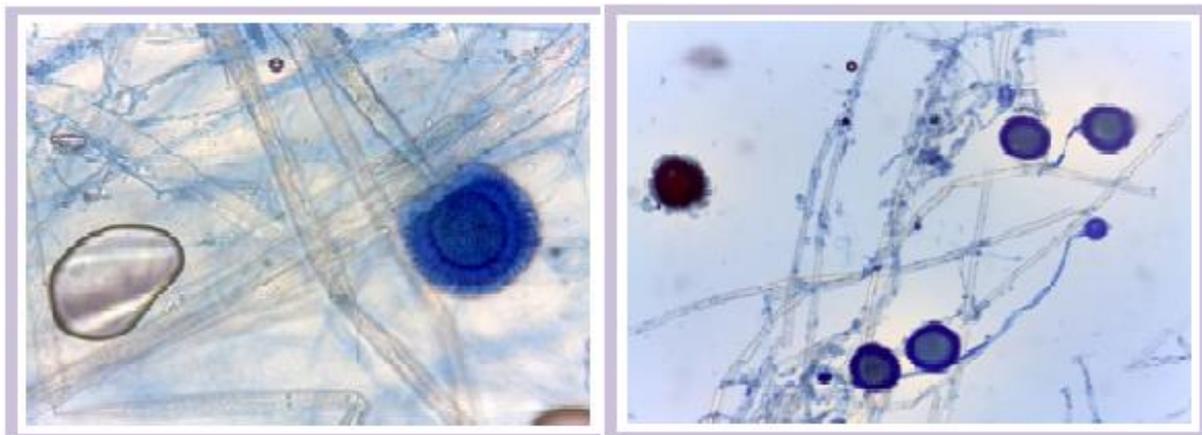
L'identification des *Aspergillus* en général se fait par la description macroscopique qui est déterminée après encensement des souches pures sur le milieu d'isolement et microscopique sous microscope optique.

Macroscopiquement, sur milieu YPD à pH 6.4 et, à 30°C. *Aspergillus tubingensis*, présente une croissance estimée en diamètre en moyenne 45mm après 7 jours (envahissement totale de la boîte). Les mycéliums ont un aspect de velours ou de feutre blanc au départ, devenant poudreux avec l'apparition des conidiocystes noirs, 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. Le revers est blanc crème à jaune pâle.



Photographie 1 : Aspect macroscopique d'*Aspergillus tubingensis* cultivée sur milieu YPD

Selon la description de Ce Xu *et al.* (2020), la morphologie microscopique, d'*Aspergillus tubingensis* montre 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 sphériques, brun, et échinulées, la paroi est rugueuse de 3-5 µm de diamètre, des sclérotés blanchâtres à roses allant de 0.5 à 0.8 mm de diamètre sont souvent produits



Photographie 2 : Aspect microscopique d'*Aspergillus tubingensis*

Ce champignon endophyte a été identifié par Meghnous *et al.* (2019) comme étant *Aspergillus tubingensis*, par comparaison des séquences du gène Calmodulin (*CaM*) avec les espèces apparentées du *GenBank*.

Selon plusieurs auteurs, la technique basée sur l'identification par la calmoduline a un haut degré de spécificité pour identifier les espèces d'*Aspergillus* au niveau de l'espèce au sein des *Aspergillus noirs* (Perron *et al.*, 2004 ; Mulé *et al.*, 2006).

3. Position systématique

Selon :([https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(16\)30140-9/fulltext#tb11](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(16)30140-9/fulltext#tb11))

Règne : Fungi

Embranchement : Ascomycota

Sous-embranchement : Deuteromycotina

Classe : Eurotiomycètes

Ordre : Eurotiales

Famille : Trichocomaceae

Genre : *Aspergillus*

Espèce : *Aspergillus tubingensis*

4. Réactivation d'endophyte fongique

La réactivation de la souche a été réalisée par repiquage du mycélium fongique préalablement conservé dans du bouillon Sabouraud à 20% de glycérol, dans des boîtes de pétries contenant le milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*) puis incubé à 30 °C pendant 96h. Les cultures obtenues servant d'inoculum pour les tests de tolérance.

5. Test de tolérance

Afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui est défini par Khan *et al.* (2018), comme la plus faible concentration d'un élément chimique, qui inhibe la croissance visible des isolats.

La détermination de la CMI a été réalisée selon la méthode décrite par Shin *et al.* (2012), qui consiste à cultiver *Aspergillus tubingensis* sur les deux types du milieu YPD supplémentés par différentes concentrations en NaCl allant de 5% jusqu'à 20% qui seront stérilisés par autoclavage à 120 °C pendant 20minute avec une pression de 1 bar.

5.1. Milieu gélosé YPD

Ce test permet aussi de voir l'effet des concentrations croissantes en NaCl sur la croissance fongique.

La gélose YPD a été supplémentée avec des doses croissantes de NaCl à savoir, 5%, 10 %, 15% et 20%, et un témoin a été préparé (0% NaCl), puisensemencée par un disque mycélien de 0.5 cm de diamètre de la souche fongique. Les boîtes de Pétri ont subi une incubation à 30 °C pendant 7 jours, trois répétitions ont été effectuées pour chaque concentration.

L'effet de la salinité est déterminé par la mesure journalière du diamètre de la croissance mycélienne de la colonie fongique par comparaison au témoin respectif non additionné de NaCl.

5.2. Bouillon YPD

Ce test permet d'évaluer l'effet du NaCl sur la croissance et sur les biomarqueurs de toxicité. La tolérance à la salinité a été étudiée sur bouillon YPD tamponné (tampon citrate

50mM à pH 6.4) afin de vérifier les variations du pH, et non tamponné, ces milieux ont été additionnés de NaCl à des concentrations de 0% (témoin), 5 %, 10 %, 15 % et 20%.

Pour la préparation des échantillons, quatre disques (0.5 cm de φ) mycéliens d'*Aspergillus tubingensis* sont ensemencés dans des flacons contenant 50mL du bouillon YPD tamponné (tampon citrate 50mM à pH 6.4 ; 20 g peptone, 20g glucose et 10g extrait de levure) et bouillon YPD non tamponné additionnés séparément de doses de NaCl : 0%, 5%, 10%, 15% et 20%. Les flacons ont subi ensuite une incubation dans un incubateur rotatif à 175rpm pendant 96 H à 30°C.

Après la durée d'incubation, une filtration est réalisée sur papier Whatman N°1, les biomasses obtenues sont lavées avec de l'eau distillée stérile afin d'éliminer les résidus du milieu de culture (Mukherjee *et al.*, 2010). L'effet de la salinité est estimé par la mesure du poids du mycélium par comparaison au témoin non additionné de NaCl (0% NaCl).

Ces biomasses obtenues servent pour la mesure de la teneur en peroxyde d'hydrogène H₂O₂, le dosage de la catalase, et la mesure des protéines totales.

6. Impact du stress oxydatif sur l'activité antioxydante

6.1. Mesure de la teneur intracellulaire en H₂O₂

La teneur en peroxyde d'hydrogène est déterminée selon la méthode de Velikova (2000). La biomasse est homogénéisée dans un bain de glace avec 5mL de TCA 0.1% (w:v). L'homogénat est centrifugé à 10000×g pendant 20 min. 1mL du surnageant est ajouté à 0.5mL de tampon phosphate 10mM (pH 7) et 1mL du KI 1M. L'absorbance est lue à 390 nm. Le taux de H₂O₂ est déterminé à partir d'une courbe d'étalonnage.

6.2. Dosage des activités enzymatiques antioxydantes

6.2.1. Préparation de l'extrait enzymatique

Les échantillons destinés aux dosages des activités enzymatiques sont préparés selon le protocole décrit par Mukherjee *et al.* (2010) et Benhamdi *et al.* (2014). La biomasse fraîche (0.5 g) est broyée en une poudre fine avec un mortier et écrasée sous l'azote liquide. Les protéines sont ensuite extraites à 4° C avec 3mL de phosphate de potassium 50mM à froid (pH 7) contenant 0.1% de triton X-100 (v/v) et 1% de polyvinylpyrrolidone

(PVP) (w/v). L'homogénat est centrifugé à 4 °C pendant 15 min à 14000×g et le surnageant est utilisé pour les dosages de la catalase et les protéines totales.

6.2.2. Dosage de la Catalase (CAT)

Le dosage de la catalase est réalisé selon la méthode de Chance et Maehly (1955). La décomposition du peroxyde d'hydrogène est déterminée par la diminution de l'absorbance à 240 nm ($\epsilon=39.4. \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Le mélange réactionnel est préparé par addition de 0.1mL d'extrait enzymatique et 2.9mL de peroxyde d'hydrogène à 50mM dans du tampon phosphate 50mM à pH 7. La lecture est effectuée à 240nm directement après l'addition de l'extrait enzymatique, chaque minute, durant 3 min au maximum. L'activité spécifique de la CAT correspond à la quantité du H₂O₂ consommée par mg de protéine (Kassa-Laouar *et al.*, 2020).

6.2.3. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales est réalisé selon la méthode de Lowry *et al* (1951), en utilisant le sérum albumine bovine (BSA) comme standard.



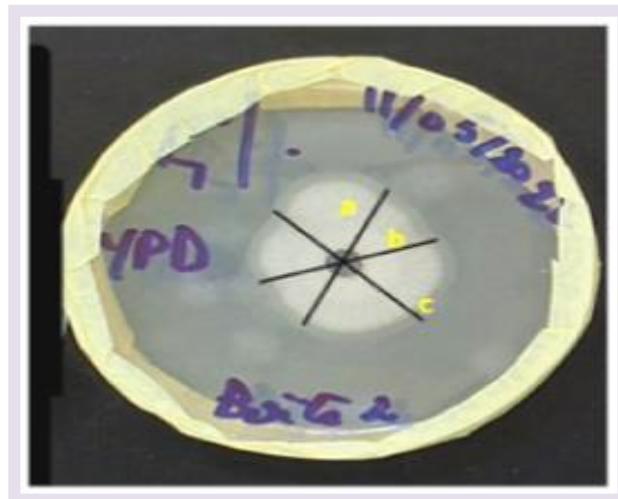
Résultats et discussion

1. Impact du stress salin sur la croissance

L'effet de l'augmentation des doses de NaCl sur la souche *Aspergillus tubingensis* a été déterminé par la mesure des diamètres des colonies dans la gélose YPD supplémentée avec de différentes concentrations en NaCl et l'estimation du poids des biomasses fongiques cultivées dans les bouillons YPD avec et sans addition du tampon citrate de sodium.

1.1. Sur milieu YPD gélosé

En se référant au témoin (0% de NaCl), une mesure journalière des diamètres des colonies fongiques (3 mesures par colonie) a été effectuée, (**photographie 3**) sur un laps de temps de 0 à 6 jours (144h), la moyenne des 3 mesures/jour a été calculée avec la soustraction du diamètre du disque mycélien servant d'inoculum qui est égale à 5mm.



Photographie 3 : Mesure de diamètre de la croissance journalière des cultures d'*Aspergillus tubingensis*

D'après la figure 4, la suivie journalière de la croissance indique qu'à 24h, 48h, et 72h il n'y avait pas de croissance, au-delà de 96h, la croissance d'*A. tubingensis* était significativement importante à 0% et 5%, moyennement à 10% et infime à 15% de NaCl après 144h par rapport au témoin.

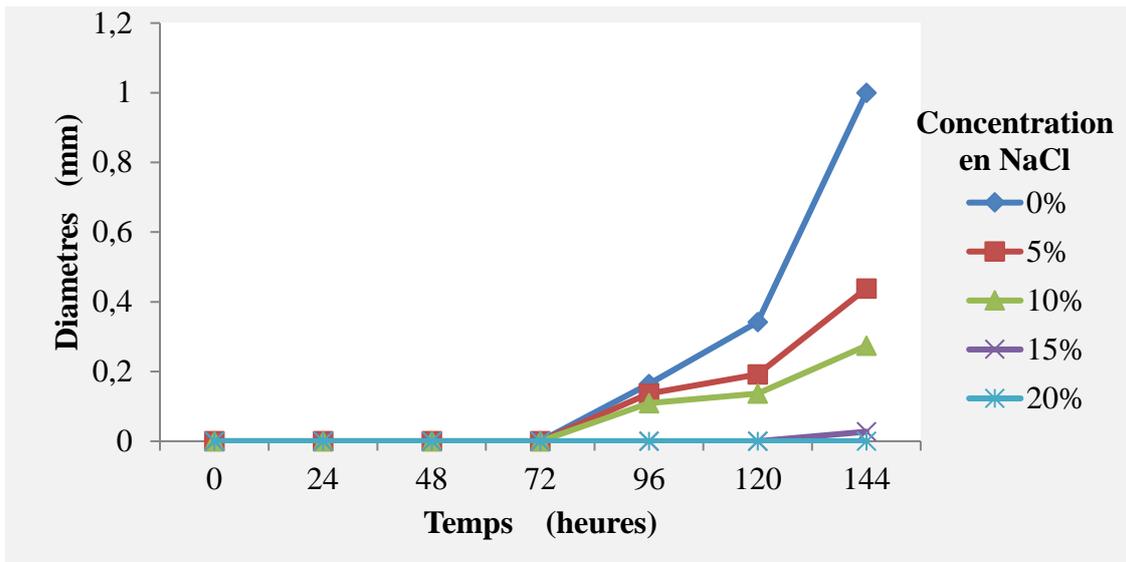


Figure 4: Courbe de croissance d'*A. tubingensis* cultivée dans un gradient de NaCl.

La photographie 4, présente l'effet du NaCl sur la croissance d'*A. tubingensis* cultivé sur la gélose YPD à différentes concentrations, les résultats obtenus montrent l'effet inhibiteur des doses croissantes sur le développement fongique qui se manifeste par une diminution significative des diamètres mycéliens avec l'augmentation des doses de NaCl dans le milieu. Cet endophyte a révélé sa capacité de tolérer jusqu'à 15% de NaCl dans la gélose YPD.

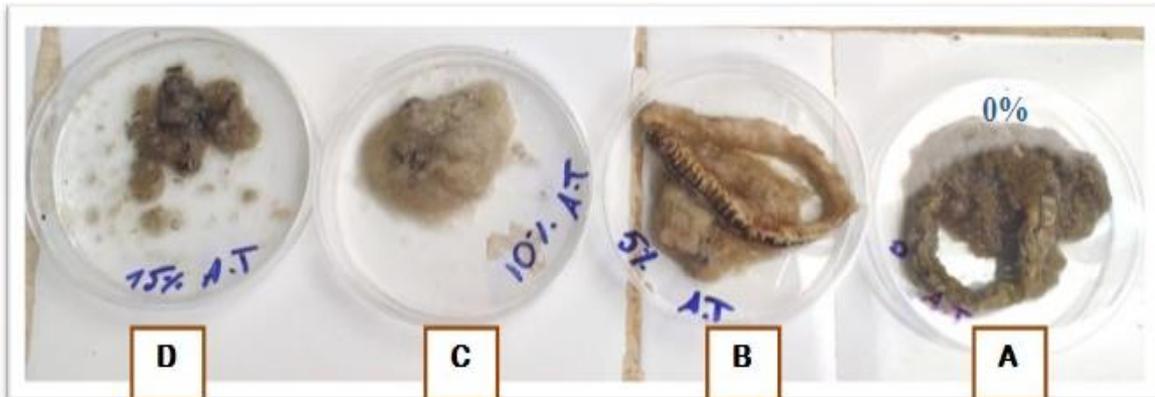


Photographie 4 : Croissance mycélienne de la souche *A. tubingensis* après 144h.

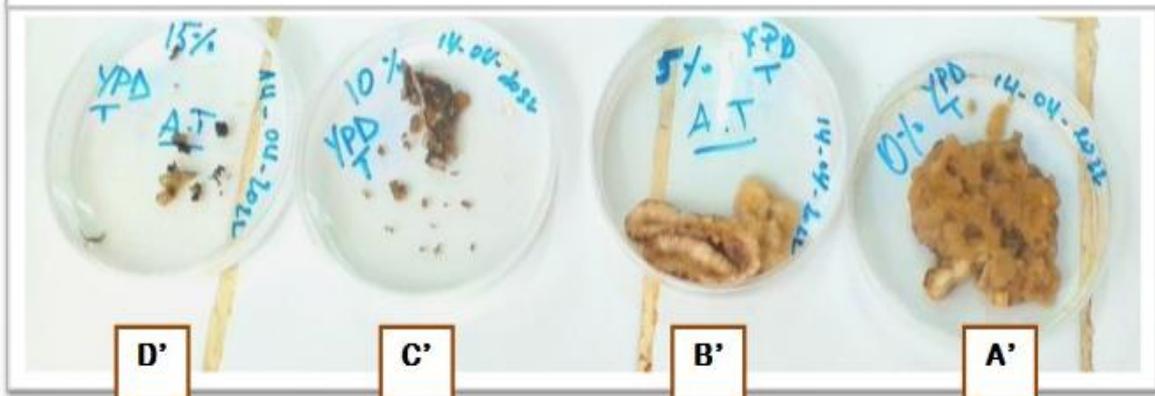
Il est à remarquer que l'augmentation du stress NaCl engendre une diminution progressive de la propagation mycélienne et la capacité de formation des spores notée à 5%, 10% et 15% NaCl par référence au témoin (photographie 4). Et au-delà de 15% de NaCl la concentration minimale inhibitrice a été déterminée.

1.2. Sur milieu YPD bouillon tamponné et non tamponné

Les biomasses obtenues à partir des cultures submergées sur bouillon MNT et MT ont montré que l'augmentation des concentrations de NaCl avait un effet remarquable sur *A. tubingensis* qui se traduit par la diminution progressive de la biomasse fongique après 96h d'incubation (photographies 5 et 6).



Photographie 5 : Effet des différentes concentrations de NaCl sur la biomasse fongique récupérée du bouillon YPD non-tamponné.



Photographie 6 : Effet des différentes concentrations de NaCl sur la biomasse fongique récupérée du bouillon YPD tamponné.

1.2.1. Estimation du poids total

La figure 2, ressort qu'*A. tubingensis* a montré une diminution graduelle de sa croissance mycélienne avec l'augmentation du stress salin dans le bouillon YPD allant de 0% jusqu'à 20%.

En comparant ces résultats avec la biomasse du milieu témoin (qui représente 100% de croissance en l'absence du NaCl dans le milieu), l'endophyte fongique révèle une très bonne

tolérance à 5% de NaCl, il a gardé 68.8% (photographie 5 B) (figure 5) de sa croissance dans le MNT et 97% dans le MT (photographie 6 B') (figure 5).

À 10% de NaCl en MNT, la souche a montré une bonne tolérance à la salinité de 65.4% par rapport au témoin, en contraste du MT où la croissance était faible avec un taux de réduction atteignant 71.4%.

La croissance a été moyennement inhibée à 15% de NaCl pour le MNT et fortement inhibée pour MT avec une réduction de 59.8% et 94.1% respectivement par rapport au témoin, aucune croissance n'a été observée à 20% de NaCl où la concentration minimale inhibitrice a été notée.

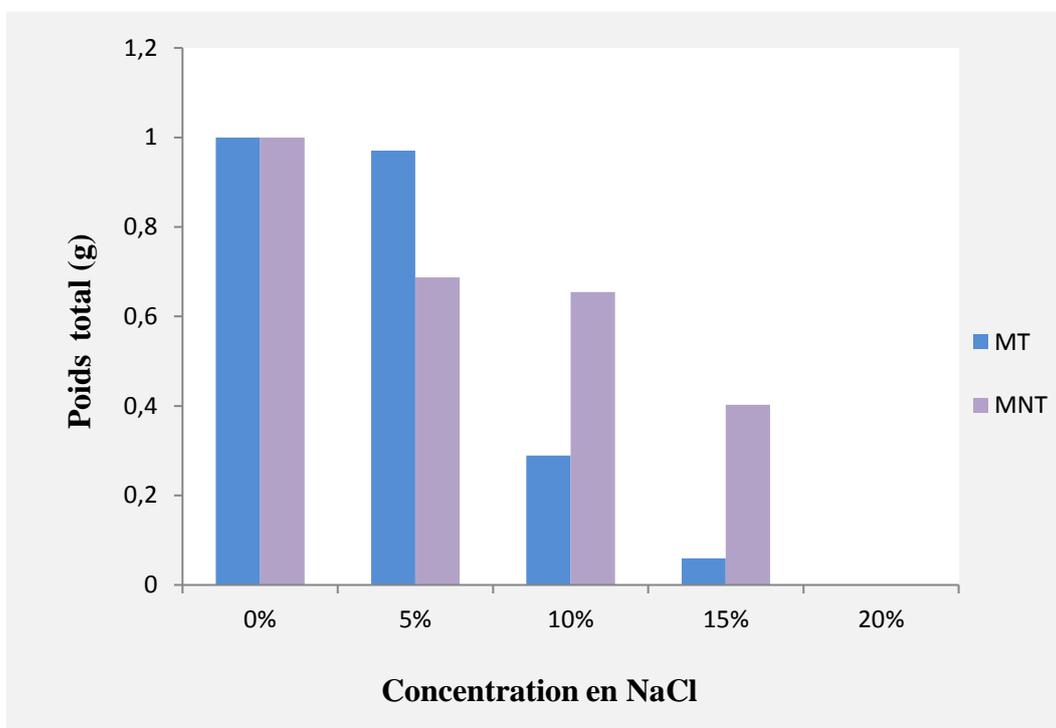


Figure 5: Variations du poids total par rapport aux concentrations de NaCl

1.2.2. Impact du stress salin sur la variation du pH du milieu résiduel

Le pH initial du bouillon YPD NT/T a été ajusté à **6.4** après autoclavage.

Le pH du milieu résiduel a été mesuré pour chaque échantillon et les valeurs ont été rapportées dans le tableau 2.

Tableau 2 : variations du pH des milieux résiduels en fonction des concentrations en NaCl.

Valeurs du pH du milieu résiduel					
	Bouillon YPD avec différentes concentrations en NaCl				
	0%	5%	10%	15%	20%
pH initial M (NT/T)	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4
pH final MNT	4.65	7.56	5.12	4.97	//
pH final MT	5.86	5.74	5.13	5.19	//

D’après le tableau 2, des variations des pH des milieux résiduels en fonction de la concentration en NaCl ont été constatées par rapport au pH initial.

Pour les témoins, le pH du milieu a diminué de 6.4 à 4.65 et 5.86 en MNT et MT respectivement. Avec l’augmentation de la dose de NaCl, le pH du milieu résiduel NT/T reste toujours dans les alentours de 5, sauf pour la concentration 5% de NaCl où le pH du MNT augmente par rapport au pH initial et tend à être légèrement alcalin.

2. Impact du NaCl sur le stress oxydatif

L’effet du NaCl a été évalué sur plusieurs marqueurs du stress oxydatif : la quantité intracellulaire du peroxyde d’hydrogène (H_2O_2), activité de la catalase (CAT) et la quantité de protéines totales.

Selon Nxele *et al.* (2017) et Meghnous (2020) la réponse au stress est intimement liée à l’accumulation des espèces réactives de l’oxygène (ROS) tel que le peroxyde d’hydrogène (H_2O_2) qui induisant un stress oxydatif intracellulaire. Grâce à une réaction catalysée par la catalase (CAT) le H_2O_2 sera réduit en oxygène et eau Ahmedizadeh *et al.* (2011).

2.1. Impact du NaCl sur la teneur intracellulaire en H_2O_2

La teneur en H_2O_2 intracellulaire d’*A. tubingensis* en fonction des concentrations de NaCl dans le milieu de culture YPD (T et NT), pour une durée de 96 h, sont représentés dans la figure 6.

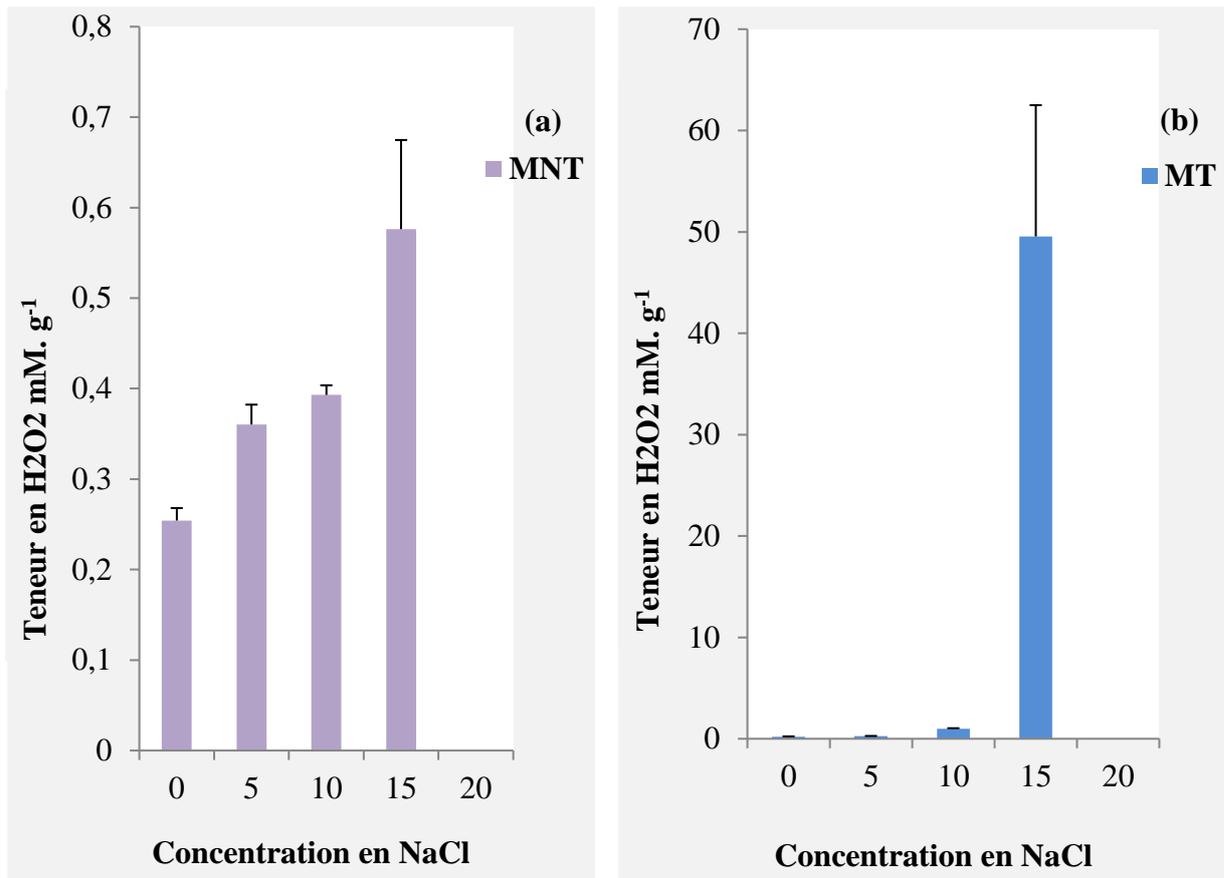


Figure 6 : Teneur intracellulaire en H₂O₂ chez *A.tubingensis* en MNT et MT

Dans le MNT le contenu en H₂O₂ augmente progressivement avec l'accroissement du stress salin, comparativement au témoin (figure 6 (a)).

15% de NaCl a provoqué une génération importante du H₂O₂ par *A. tubingensis*, atteignant 226.77%. L'augmentation est de 144% et 156% à 5% et 10% respective au témoin.

Tandis que la synthèse de ce prooxydant dans le MT augmente progressivement avec l'augmentation de NaCl dans le milieu (figure 6 (b)), elle est légèrement significative à 5%, moyennement significative à 10% et hautement significative à 15% de NaCl de 135%, 495% et 24775% respectivement par rapport au témoin.

Les concentrations en H₂O₂ libérées présentent une relation proportionnelle avec les doses de NaCl et inversement proportionnelle avec le poids de la biomasse fongique.

2.2. Impact du NaCl sur l'activité de la catalase

Il ressort de la figure 7, que l'activité de la CAT dans le MNT augmente progressivement avec l'augmentation des concentrations en NaCl ; à 15 % de NaCl la CAT atteint son activité maximale de $4.21 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}\text{prot}$ avec un taux d'accroissement de 507.23% par rapport au témoin, à 5% et 10% de NaCl l'activité de la CAT est supérieure à celle du témoin de 357% et 232% respectivement. La CAT est corrélée avec les doses de NaCl et la teneur en H_2O_2 .

Dans l'ensemble, comme montré dans la figure 7, dans le MT et à 5% de NaCl, l'activité spécifique de la CAT d'*A. tubingensis* atteint son niveau le plus élevé avec un taux d'augmentation atteignant 213% par rapport au témoin.

Au-delà de 5% NaCl une diminution de l'activité de la CAT a été enregistrée ; le taux de diminution par référence au témoin était de 37% à 15% de NaCl, alors qu'à 10% l'activité de la CAT enregistre sa valeur minimale $0.04 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}\text{prot}$, avec un taux de réduction de 99.2% par rapport au témoin.

L'activité de la CAT est directement proportionnelle avec les concentrations en NaCl ainsi que le H_2O_2 à 0 et 5% de NaCl.

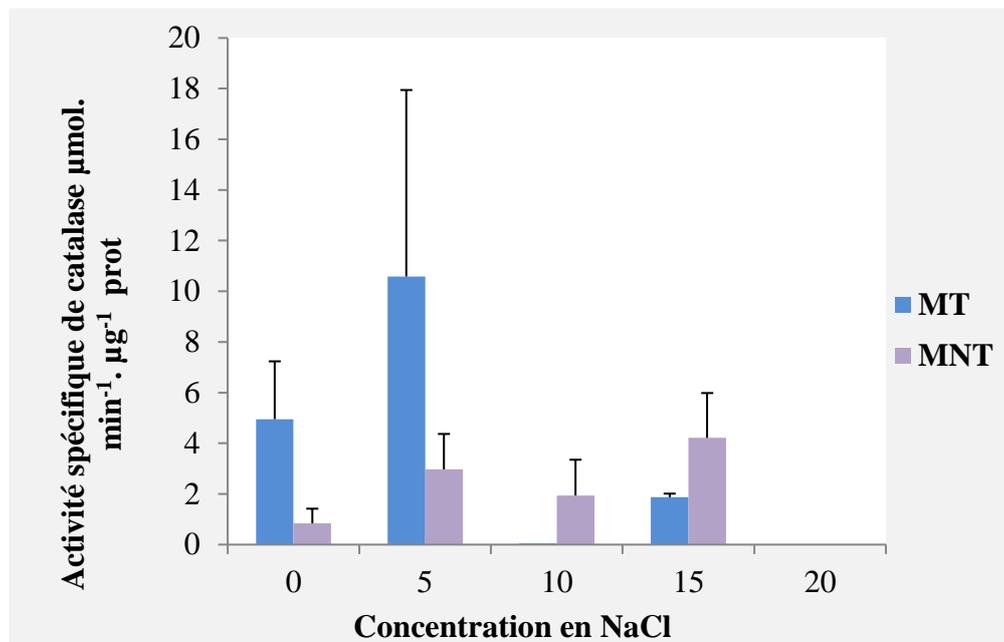


Figure 7 : Activité de la catalase en fonction de la concentration de NaCl dans le MNT et MT.

2.3. Impact du NaCl sur la teneur des protéines totales

Les résultats du dosage des protéines totales en présence de NaCl dans le milieu de culture après réaction avec le Folin-Ciocalteu à l'abri de la lumière pour durée de 45min sont enregistrés sur la figure 8.

Les résultats montrent que les biomasses issues de la culture dans un MNT additionnées avec 5% NaCl, renferment la teneur en protéines la plus importante avec un pourcentage de 114.5% par rapport à celle du témoin. Les quantités de protéines à 10% et 15% ont présenté une diminution avec un taux de réduction de 15.3% et 13.3% respectivement que celle du témoin.

Cependant, les concentrations en protéines du MT additionné de NaCl sont nettement plus élevées à 10% et 15%, atteignant les concentrations maximales à 10% de $134.12\mu\text{g. mL}^{-1}$ et $125.72\mu\text{g. mL}^{-1}$ respectivement par rapport au témoin, or, l'apport de 5% de NaCl dans le milieu de culture provoque une baisse de la teneur en protéines totales par rapport aux autres concentrations de NaCl, néanmoins le taux de protéines se rapproche de celui du témoin.

La concentration des protéines en MNT est directement proportionnelle avec le pH du milieu résiduel.

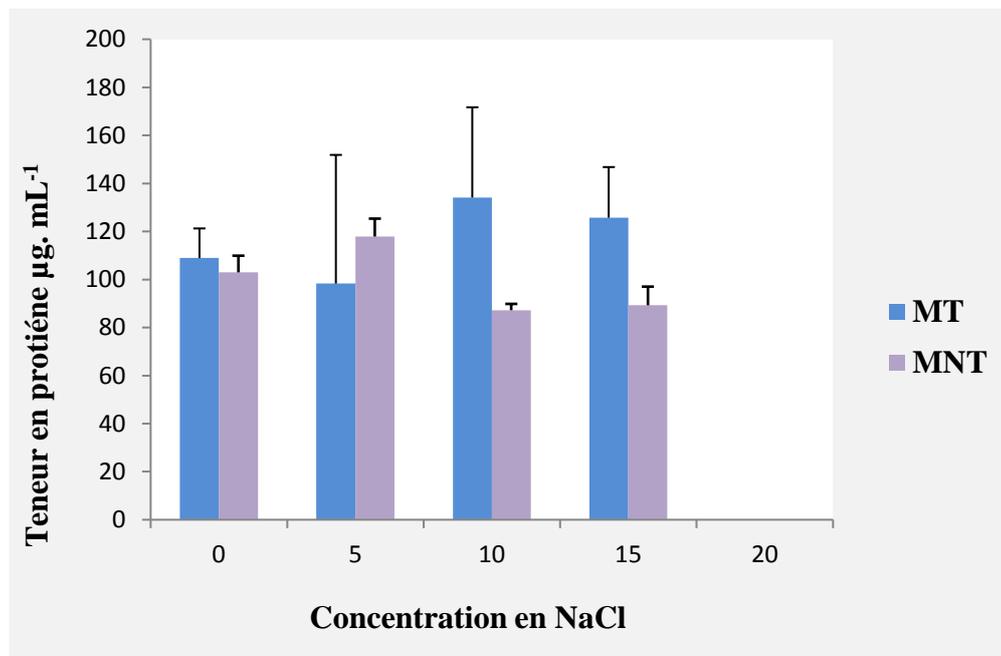


Figure 8: Teneur en protéines totales en fonction de concentration en NaCl dans le MNT et MT

Discussion

Selon Porcel *et al.* (2011), la salinité des sols affecte négativement les organismes vivants non seulement les plantes mais également les microorganismes associés notamment les champignons endophytes.

En effet, une investigation était établie sur l'hypothèse qu'*Aspergillus tubingensis*, champignons endophytes résistant aux concentrations élevées de métaux lourds pourrait tolérer des doses élevées en NaCl en raison de son adaptation préalable aux conditions de stress. Plusieurs études, notamment celle de Ayangbenro et Babalola (2017) affirment que la tolérance des souches isolées des milieux extrêmes varie en fonction de leur origine et des conditions environnementales dans lesquelles elles se développent.

De plus, d'après Das *et al.* (2022) les champignons halophiles nécessitent plus de 2% de sel pour leur croissance et ils sont divisés en halophiles légers (2-5%), halophiles modérés (5-20%), et halophiles extrêmes (20-30%). Dans la présente étude, *A.tubingensis* a révélé une tolérance jusqu'à 15% NaCl ce qui permet de le qualifier étant un mycoendophyte halotolérant, rappelant que cette souche provient des racines d'une plante hyperaccumulatrice de sels de métaux.

L'effet des concentrations croissantes de NaCl sur la croissance fongique est traduit par la diminution progressive du développement fongique sur les deux types du milieu YPD la gélose et le bouillon. Cette diminution peut être expliquée par la modification des mécanismes physiologiques des souches tests en réponse à la salinité du milieu, ce qui conduit à des dommages dans les membranes cellulaires (Meghnous *et al.*, 2019 ; Jiménez-Gómez *et al.*, 2020 ; Raid *et al.*, 2021).

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Fadhela (2017) sur la croissance des endophytes isolés des racines de palmiers dattiers dont *Aspergillus terreus* et *Fusarium oxysporum* qui ont résisté jusqu'à 75g/L de NaCl additionné au milieu PDA.

Quant aux variations des pH des milieux résiduels non tamponné et tamponné ont montré des diminutions par rapport au pH initial qui a été ajusté à 6.4. Cette diminution du pH par rapport au témoin dans les milieux résiduels NT/T peut être due à la production des acides organiques par *A. tubingensis* à l'état de stress, cette hypothèse est confirmée par Fomina *et*

al. (2005) que le champignon libère des concentrations notables d'acides acétiques, citrique et oxalique pendant sa croissance ce qui va de solubiliser des différents minéraux.

L'augmentation observée à 5 % de NaCl peut être suggérer à la solubilisation des protéines du milieu en acides aminés basiques, d'ailleurs Fomina *et al.* (2005) et Chakraborty *et al.* (2014) dans leurs travaux suggèrent que l'acide oxalique est un agent chélateur capable de mobiliser efficacement les métaux à des pH neutres et même basiques.

Le pH se révèle quasi-constant pour les autres concentrations en NaCl autres que 5% dans le MNT cela peut être dû à des mécanismes intrinsèques développés par *A. tubingensis* pour se défendre afin de maintenir le pH du milieu constant et dans son intervalle optimal de croissance. Par ailleurs, la stabilité du pH durant la période de la croissance dans le MT s'explique par l'ajout du tampon citrate de sodium, selon Jain *et al.* (2020) l'objectif principal de l'addition d'un tampon est de contrôler son pH.

Les stress environnementaux tels que l'exposition aux métaux lourds favorisent la formation d'espèces réactives d'oxygène (ROS), telles que les radicaux hydroxyles (OH^\bullet), les radicaux superoxydes (O_2^\bullet) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui pourraient induire ou exacerber un stress oxydatif intracellulaire. Ces ROS peuvent entraîner une oxydation non spécifique des protéines et des lipides membranaires ou endommager l'ADN (Lazarova *et al.*, 2014). Les mécanismes de défense qui neutralisent l'impact des ROS, notamment les systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, existent dans toutes les cellules aérobies.

La présence de NaCl dans le milieu de culture a induit l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui pourraient provoquer un stress oxydatif intracellulaire (Lei *et al.*, 2017 ; Meghnous *et al.*, 2019). Ces ROS peuvent entraîner une oxydation non spécifique des protéines et des lipides membranaires ou endommager l'ADN (Lazarova *et al.*, 2014).

D'après la littérature scientifique le H_2O_2 est un sous-produit inévitable de tous les organismes vivants aérobiques pour produire de l'énergie, et qui devient un indicateur de stress -voir prooxydant- quand sa teneur se révèle plus élevée par rapport à celle du témoin.

L'augmentation très significative des teneurs intracellulaires du H₂O₂ d'*A.tubingensis* dans les milieux NT/T en fonction des concentrations graduelles de NaCl, peut s'expliquer par la forte pression oxydative (Ben-Yahmed, 2013) dû à l'augmentation des concentrations en NaCl dans les milieux, les résultats de ce travail sont identiques à ceux de Chakraborty *et al.* (2014) sur stress induit par le cadmium sur *A. foetidus* et de Meghnous *et al.* (2019) sur stress induit par l'antimoine sur la même espèce.

Les dommages oxydatifs augmentent par des niveaux accrus de H₂O₂ à la sécheresse et à la salinité se manifestant par une mort cellulaire étendue associée à une biomasse réduite (Nxeleet *al.*, 2017). De ce fait, des antioxydants enzymatiques vont se produire pour détoxifier, neutraliser le stress et dégrader ces prooxydants afin de remettre les cellules à leurs états d'équilibre.

L'activité catalasique se manifeste par une augmentation progressive avec les concentrations en NaCl et par conséquent les teneurs en H₂O₂ produits par *A.tubingensis* en MNT. Cette augmentation peut être induite par le H₂O₂ généré par le stress de NaCl, ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Kassa-Laouar *et al.* (2020) sur des activités de la CAT en présence de Sb chez *S. marcescens*.

Selon Hameed *et al.* (2014) le peroxyde d'hydrogène produit est à son tour piégé par la CAT, cette dernière a été définie par Porcelet *al.* (2011) étant un système qui réagit avec les formes actives de l'oxygène et les maintiennent à un faible niveau.

La CAT catalyse la réaction de détoxification d'H₂O₂ générés sous des conditions de stress en l'utilisant comme substrat afin de le transformer en eau (H₂O) et en oxygène (O₂) (Belli *et al.*, 2010). Elle protège les lipides, les protéines et les acides nucléiques cellulaires des dommages causés par H₂O₂ et d'autres ROS (Kassa-Laouar *et al.*, 2020). Cependant, l'inhibition de la CAT à de fortes concentrations de NaCl peut être justifiée par une surproduction de peroxyde d'hydrogène.

Selon Atliet *al.* (2006) la diminution de l'activité de CAT peut être liée à la liaison directe du polluant aux groupes -SH de la molécule enzymatique, d'autres auteurs ont suggéré que l'inhibition de la CAT peut être une conséquence d'un effet direct du polluant sur les composés de poids moléculaire élevé comme la CAT.

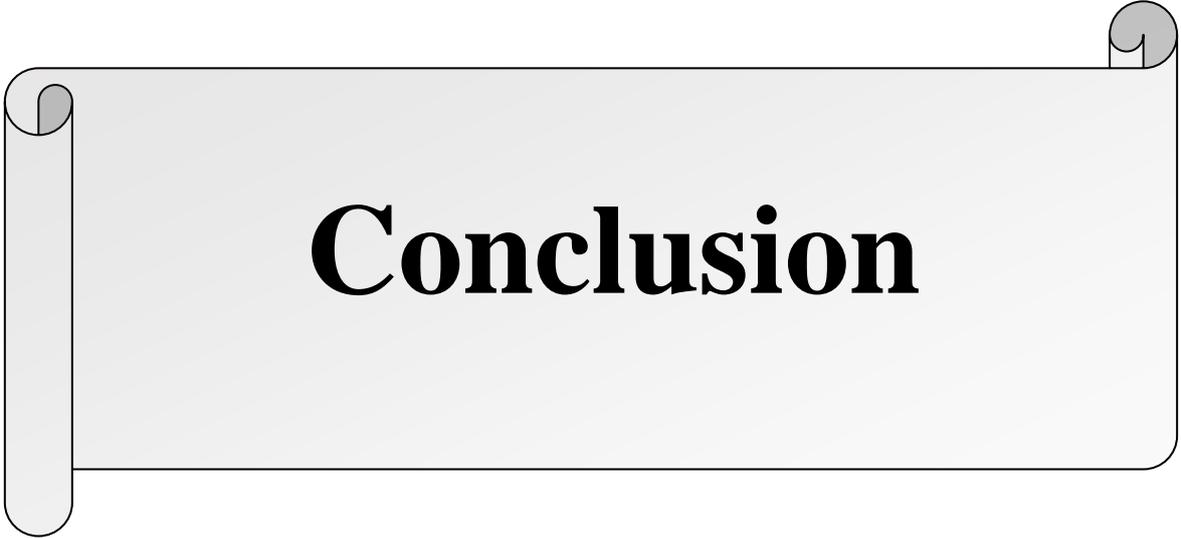
De même, Belli *et al.* (2010) ont expliqué la diminution de la CAT par l'augmentation de l'activité des superoxydes dismutases qui augmentent leur concentration dans la cellule par production de l'anion superoxyde en excès. Ils ont expliqué également l'altération de l'activité enzymatique par la liaison des cations du polluant aux enzymes, ces cations peuvent inhiber aussi que stimuler la fonction catalytique de l'enzyme.

Les ROS et plus spécifiquement le H₂O₂ est très létal et cause des dommages importants aux protéines par leurs oxydations (Das et Roychoudhury, 2014). De ce fait, des diminutions des teneurs en protéines totales ont été constatées par rapport aux teneurs des témoins, ceci peut être élucidé par rapport à la répression de la synthèse protéique due à la forte salinité et aux variations du pH entraînant une modification de la forme de la protéine, elle peut être réversible si les variations de pH ne sont pas trop importantes ce qui explique les augmentations des teneurs en protéines totales.

Ces résultats sont en accord avec Dasgupt *aet al.* (2010) qui ont rapporté expérimentalement que chez *Cerriops* la protéine totale de la feuille a diminué sous des concentrations plus élevées de traitement salin.

Selon Badawy *et al.* (2021) le stress de la salinité provoque une répression dans la synthèse des protéines, ce qui est probablement une raison majeure de la baisse de la teneur en protéines brutes. Tandis que Parida *et al.* (2002) ont expliqué la diminution en raison de l'activité accrue de la protéase. La dégradation des protéines induite par le stress peut être essentielle, car elle fournit des acides aminés (cela confirme l'hypothèse de l'augmentation brusque du pH à 5 % de NaCl) pour la synthèse de nouvelles protéines adaptées à la croissance ou à la survie dans des conditions modifiées (Dasgupta *et al.*, 2010).

Mansour (2000) a signalé que la biosynthèse des protéines diminuait dans des conditions de stress salin, alors que les cellules synthétisent de préférence certaines protéines spécifiques du stress (Dasgupta *et al.*, 2010).



Conclusion

La recherche sur la réponse antioxydante chez les mycoendophytes exposées à la salinité n'a pas été aussi étendue que dans le cas de l'exposition des plantes supérieures aux métaux lourds, mais une quantité importante de données a été recueillie au cours de ces dernières années. Le rôle des enzymes antioxydantes qui détoxifient les ROS notamment le H_2O_2 pour l'atténuation du stress induit par la salinité a été prouvé.

De ce fait, la souche *Aspergillus tubingensis* a présenté une résistance jusqu'à 15% de NaCl dans le milieu de culture en produisant une biomasse importante à cette même concentration, une concentration qui pourrait être létale pour certaines souches.

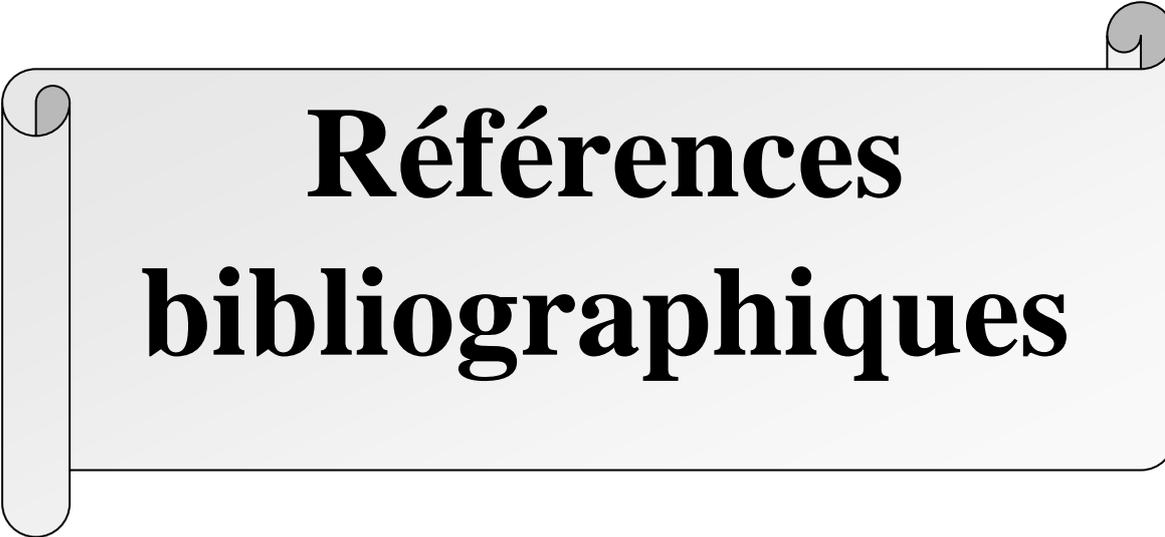
Les analyses *in vitro* de l'activité antioxydante d'*Aspergillus tubingensis* ont mis en évidence que les niveaux élevés en NaCl dans le milieu de culture, induisent chez ce mycoendophyte une libération importante de H_2O_2 , engendrant des dommages oxydatifs aux biomolécules, ce qui va stimuler par conséquent une production d'enzymes antioxydantes, telles que la CAT pour neutraliser et détoxifier les ROS générés par la pollution de NaCl et rendre l'équilibre cellulaire.

Un tel résultat met en relief qu'*A. tubingensis* isolé d'une zone minière s'adapte aux conditions de stress, ce qui permet l'utilisation de ce champignon dans la bioremédiation des sols salins, qui est une avancée prometteuse pour son rôle potentiel en tant que microorganisme modèle approprié pour l'élimination du NaCl, qui peut être utilisé seul, en tant qu'une solution sporale, ou en symbiose avec les plantes afin de pallier les effets délétères du stress salin.

Le présent travail, ouvre de nouvelles perspectives de recherches comme, l'étude des interactions intracellulaires et intercellulaires moléculaires lors du stress salin, ainsi que la manière dont les mycoendophytes peuvent s'adapter à ce stress devrait être une priorité à l'avenir.

Si l'on identifie un seul gène candidat responsable de l'atténuation chez les mycoendophytes, il sera plus utile pour les recherches futures et pour procéder à une manipulation transgénique qui permet d'attribuer cette propriété aux autres organismes comme les plantes.

Cela ne pourra être atteint sauf si nous disposons de connaissances suffisantes sur l'analyse génomique et métabolique des mycoendophytes cultivées dans des conditions de stress salin. Il pourra être également utilisé *Aspergillus tubingensis* comme une ressource biologique pour fournir des molécules bioactives d'importance pharmacologique et industrielle.



Références bibliographiques

- Abdel-Azeem, A. M., Salem, F. M., Abdel-Azeem, M. A., Nafady, N. A., Mohesien, M. T., Soliman, E. A.** (2016). Biodiversity of the Genus *Aspergillus* in Different Habitats. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier. 3-28.
- Abu-Sharar T.M., Bingham F.T., Rhoades J.D.** (1987). Stability of soil aggregates as affected by electrolyte concentration and composition. *Soil Science Society of America Journal*. 51(2), 309–314.
- Bosoi, C. R., Rose, C. F.** (2013). Oxidative stress : A systemic factor implicated in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 28(2), 175-178.
- Aebi, H.** (1984). Catalase in vitro. In *Methods in enzymology*. Academic press, 105, 121-126.
- Ahmadizadeh, M., Valizadeh, M., Zaefizadeh, M., Shahbazi, H.**(2011). Antioxidative protection and electrolyte leakage in durum wheat under drought stress condition. *Journal of Applied Sciences Research*, 7(3), 236-246.
- Ali, R., Gul, H., Hamayun, M., Rauf, M., Iqbal, A., Shah, M., Hussain, A., Bibi, H et Lee, I. J.** (2021). *Aspergillus awamori* ameliorates the physicochemical characteristics and mineral profile of mung bean under salt stress. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 8(1), 1-13.
- Atli, G., Alptekin, Ö., Tükel, S. et al.** (2006). Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143 (2), 2018-224.
- Ayangbenro, A.S., Babalola, O.O.**(2017). A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. *International journal of environmental research and public health*, 14(1), 94.
- Agarry, S.E., Ogunleye, O.O.,** (2012). Factorial designs application to study enhanced bioremediation of soil artificially contaminated with weathered Bonny light crude oil through biostimulation and bioaugmentation strategy. *J. Environ. Protect*, 3(8) ,748-759.
- Ait El Mokhtar, M.** (2020). Roles des champignons mycorhizies arbusculaires autochtones et du compost dans l'amélioration de la tolérance du palmier dattier au stress salin. Thèse de doctorat : Biotechnologie et physiologie végétales. Marrakech : université Cadi Ayyad ,187p.

- Anusha, P., Narayanan, M., Natarjan, D., Kandasamy, S., Chinnathambi, A., Alharbi, S., Brindhadevi K.** (2021). Assessment of hexavalent chromium (VI) biosorption competence of indigenous *Aspergillus tubingensis* AF3 isolated from bauxite mine tailing. *Chemosphere*, 282.
- Asghari, H.R; Amerian, M. and Gorbani, H.** (2008). Soil Salinity affects arbuscular mycorrhizal colonization of halophytes. *Pakistan Journal of Biological Science*, 11 (15), 1909-1915.
- Badawy, A.A., Alotaibi, M.O., Abdelaziz, A.M. et al.** (2021). Enhancement of Seawater Stress Tolerance in Barley by the Endophytic Fungus *Aspergillus ochraceus*. *Metabolites*, 11 (7).
- Baize, D. Jabiol, B.** (2011). Guide pour la description des sols. Éditions Quae. 430p. - Savoir faire.
- Baltruschat, H., Fodor, J., Harrach, B. D., Niemczyk, E., Barna, B., Gullner, G., Janeczko, A., Kogel, K., Schäfer, P., Schwarczinger, I., Zuccaro, A., Skoczowski, A.** (2008). Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytologist*, 180(2), 501-510.
- Barouki, R.** (1999). La cellule stressée. *médecine/sciences*, 15(12).
- Belli, N., Mesbah, L., Chebab, S. et al.** (2010). Stress oxydant induit par la coexposition au plomb et au cadmium : deux contaminants des eaux souterraines de Oued Nil (Jijel - Algérie). *Journal of Water Science*, 23(3), 289–301.
- Benabderrahmane, S.** (2021). Réponse biochimique et phytochimique d'une Fabacée soumise au stress salin, cas de *Vicia faba* L. Thèse de doctorat : science de l'environnement. Sidi bel abbes : université Djillali Liabes, 144p.
- Benhamdi, A.** (2014). Etude des enzymes de stress oxydatif chez *Hedysarum pallidum* Desf. et *Lygeum spartum* L. en réponse à la pollution du sol par l'antimoine. Thèse de doctorat : Biochimie et Biotechnologie. Constantine : Université Frères Mentouri Constantine, 104p.
- Benhamdi, A., Bentellis, A., Rached, O., Du Laing, G., Mechakra, A.** (2014). Effects of antimony and arsenic on antioxidant enzyme activities of two Steppic plant species in an old antimony mining area. *Biol Trace Elem Res*, 158(1), 96–104.
- Ben-Yahmed, J** (2013). Etude des propriétés de tolérance au déficit hydrique et au stress salin de génotypes appartenant au genre *Poncirus* et au groupe des mandariniers. Thèse

- de doctorat : Biologie Intégrative des Plantes. Montpellier : Centre international d'études supérieures en sciences agronomiques, 200p.
- Bosoi, C. R., Rose, C. F.** (2013). Oxidative stress : A systemic factor implicated in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 28(2), 175-178.
- Brady, N. C., Weil, R. R., Weil, R. R.** (2008). The nature and properties of soils, 13, 662-710.
- Bud R.**(1989).Janus-faced biotechnology: an historical perspective *Trends in biotechnology*,7(9) ,230-233.
- Brundett, M.** (2006). Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. *Microbial Root Endophytes*, 9, 281-298.
- Buchanan, B. B., Gruissen, W., Jones, R. L.** (2000). Biochemistry and molecular biology of Plants. *American Society of Plant Physiologists*, 35(1).
- Chakraborty, S., Mukherjee, A., Khuda-Bukhsh, A.R. et al** (2014). Cadmium-induced oxidative stress tolerance in cadmium resistant *Aspergillus foetidus* : it's possible role in cadmium bioremediation. *Ecotoxicol Environ Safet*, 106, 46–53.
- Chen, L. Wu, J. Xia, C. Gong, L. Xu, Z.** (2019). Chemical speciation and potential ecological risk assessment of heavy metals in volcanic rocks of Southern Qinghai, China. *Chemistry annd ecology*, 36(10), 967-981.
- Chongwang, J.** (2017). Deux mois seulement pour dégrader les déchets plastiques. *Afrique Sub-Saharienne*, 6(2).
- Das, K., Roychoudhury, A.** (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in environmental science*, 2(53).
- Das, T., Al-Tawaha, A.R.M., Pandey, D.K., Nongdam, P., Shekhawat, M., Dey, A., Choudhary, K et Sahay, S.** (2022). Halophilic, Acidophilic, Alkaliphilic, Metallophilic, and Radioresistant Fungi: Habitats and Their Living Strategies. Singapore : Springer. 171-193.
- Dasgupta, N., Nandy, P., Chandrakant, Tet Das, S.** (2010). Salinity-imposed changes of some isozymes and total leaf protein expression in five mangroves from two different habitats : *Journal of Plant Interactions*, 5(3). 211-221.
- Deacon, J.**(2005).Fungal Biology .Wiley-VCH. 380p.
- Desmier, T.** (2016). Les antioxydants de nos jours : Définition et applications. Thèse de Doctorat: Faculté de Pharmacie. Université de Limoges, 88p.

- Djili, K., Daoud, Y.** (1999). Distribution latérale et verticale de l'ESP dans les sols du Nord de l'Algérie. Actes du séminaire sur la salinisation des terres agricoles en Algérie. Chlef, 1,25- 44.
- Djili, K., Daoud, Y., Toua, F. L.** (2000). La salinisation et la sodisation des sols en Algérie. Actes du congrès scientifique arabe, El-Oued, 215-223.
- Dutuit, P., Pourrat, Y., Dutuit, J. M.** (1994). La notion de stress de la cellule à l'écosystème. *Science et changements planétaires / Sécheresse*, 5(1), 23-31.
- Fadhela, M.M.** (2017). Activité biologique de champignons endophytes isolés du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Thèse de doctorat : Phytopathologie. El Harrach : Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach, 189p.
- Fan, M., Xiao, X., Guo, Y., Zhang, J., Wang, E., Chen, W., Lin, Y., Wei, G.**(2018). Enhanced phytoremediation of *Robinia pseudoacacia* in heavy metal contaminated soils with rhizobia and associated bacterial community structure and function. *Chemosphere*, 197, 729-740.
- Faye, E., Sane, S. K., Ba, A., Camara, B.** (2021). Comportement sous serre de *Casuarina equisetifolia* L., *Gossypium hirsutum* L. et *Jatropha curcas* L. soumis au stress salin. *Journal of Applied Biosciences*, 160, 16521-16535.
- Fomina, M., Hillier, S., Charnock, J. M., Melville, K., Alexander, I. J., & Gadd, G. M.** (2005). Role of oxalic acid overexcretion in transformations of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 371-381.
- Ghamnia, Y.** (2014). Action de la salinité sur les caractéristiques physiologiques, biométriques, hydriques et minérales de la fève *Vicia faba* L. conduite dans un substrat sableux amendé à 7 % de bentonite. Mémoire de magister : Ecophysiologie Végétale. Algérie : université d'Oran, 129p.
- Gill, S. S. and Tuteja, N.** (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Giridhar, Babou, A.,Sudhakara, Reddy, M.** (2011). *Aspergillus tubingensis* Improves the Growth and Native Mycorrhizal Colonization of Bermudagrass in Bauxite Residue. *Bioremediation Journal*, 15(3), 157-164.
- Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P. J., Azevedo, R. A.** (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32(6), 481-494.

- Hakeem, S., Ali, Z., Saddique, M. A. B., Habib, U. R., Rahman, M., Trethowan, R .** (2021). Leaf prickles and longitudinal grooves help wheat plants capture air moisture as a water-smart strategy for a changing climate. *Planta*, 254(1), 1–11.
- Haluskova, L., Valentovicova, K., Huttova, J., Mistrik, I., Tamas, L.** (2010). Effect of heavy metals on root growth and peroxidase activity in barley root tip. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(1), 59-65.
- Hameed, A., Dilfuza, E., Abd-Allah, E. F., Hashem, A., Kumar, A., et Ahmad, P.** (2014). Salinity stress and arbuscular mycorrhizal symbiosis in plants. *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses*, 1. 139-159. Springer, New York, NY.
- Hocine, F. M., Gorine, M.** (2017). Évaluation de l'exposition au Plomb et Cadmium et impact sur quelques paramètres du statut oxydant/anti oxydant chez les ouvriers exposés aux fumées de soudage. Mémoire de fin d'étude: Toxicologie Industrielle et Environnementale. Tlemcen: Université Abou bekr belkaid, 50p.
- Hopkins, W.G.** (2003). *Physiologie Végétale*. 514p.
- Jain, A., Jain, R., Jain, S.** (2020). *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology: Principles and Techniques*. New York City : Humana press. 296p.
- Jiménez-Gómez, A., García-Estévez, I., García-Fraile, P., Escribano-Bailón, M. T., et Rivas, R.** (2020). Increase in phenolic compounds of *Coriandrum sativum* L. after the application of a *Bacillus halotolerans* biofertilizer. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(6), 2742-2749.
- Jullien, D.** La recherche des polluants dans les sols. Séminaire "Sols Pollués", Jun 1997, Paris, France.19-28p.
- Kassa-Laouar, M., Aicha Mechakra, A., Rodrigue, A., Meghnous, O., Bentellis, A., Rached, O.** (2019). Antioxidative Enzyme Responses to Antimony Stress of *Serratia marcescens* an Endophytic Bacteria of *Hedysarum pallidum* Roots. *Polish Journal of Environmental studies*, 29(1), 1-12.
- Kennedy, P., Boniface, A. N., Liang, Z. J.; Muller, D., Murray, R. M.** (1992). Intake and digestion in swamp buffaloes and cattle. The comparative response to urea supplements in animals fed tropical grasses. *J. Agric. Sci*, 119(2), 243-254.
- Khan, R., Shahzad, S., Choudhary, M. I., Khan, S.A., Ahmad, A.** (2007). Biodiversity of the endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* (AIT.) R. BR. *Pak J Bot.* 39 (6), 2233-2239.

- Khan, A. R., Mahmood, U. I., Hassan, M., Ahmad, R., Munir, A.** (2018). Arsenic Tolerance Potential Of Fungi Isolated From Polluted And Non-Polluted Soils Of Pakistan. *Pakistan J Agric Res*, 30(1),17-28.
- Khan, B.A., Warner, P., Wang, H.** (2014). Antibacterial Properties of Hemp and Other Natural Fiber Plants, *Bioresources*, 9(2), 3642-3659.
- Khan, S., Irfan Qureshi, I., Tanweer Alam, K., Abdin, M.** (2007). Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. *Centre for Transgenic Plant Development, Department of Biotechnology*, 6(3), 175-178.
- Khan, S., Nadir, S., Shah, Z.U., Shah, A.A., Karunarathna, S.C., Xu, J., Khan, A., Munir S., Hasan, F.** (2017). Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*. *Environmental Pollution*. 225, 469-480.
- Khouja, H.R.** (2011). Identification par approches moléculaires de gènes impliqués dans la tolérance au stress oxydatif chez le champignon mycorhizien *Oidiodendron maius*. Thèse de doctorat : Sciences et Technologies. France: Ecole Doctorale Ressources, Procédés, Produits, Environnement Université Henri Poincaré, Nancy 1 et Ecole Doctorale des Sciences et Hautes Technologies Université des Etudes de Turin, 165p.
- Kouadria, R.** (2019). Contribution des champignons endophytes à la tolérance aux facteurs adverses (biotiques et abiotiques) des espèces cultivées : isolement des champignons endophytes et étude de leur contribution à la tolérance à la salinité ou à des polluants. Thèse de doctorat : Production Agricole et Développement Agricole Durable. Mostaganem : Université Abdelhamid Ibn Badis, 195p.
- La Santé publique France.** Sols [en ligne] (page consultée le 20/06/2022)
<https://www.santepubliquefrance.fr/determinants-de-sante/pollution-et-sante/sols>
- Laib, D. E., Benzehra, A., Rahmani, Y., Boulaouad, B. A., Akkal, S.** (2022) .L'emploi de l'extrait du champignon endophyte *Aspergillus niger* isolé à partir des feuilles du ricin commun *Ricinus communis* L comme agent de lutte biologique contre le criquet migrateur *Locusta migratoria* L. *Journal of Applied Biosciences*, 170, 17720-17728.
- Lazarova, N., Krumova, E., Stefanova, T., Georgieva, N., et Angelova, M.** (2014) The oxidative stress response of the filamentous yeast *Trichosporon cutaneum* R57 to copper, cadmium and chromium exposure, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28(5), 855–862.

- Legros, P. J.-P.** (2009). *LA SALINISATION DES TERRES DANS LE MONDE*, 22/06/2009, Académie des Sciences et Lettres de Montpellier, 14p.
- Lei, P., Pang, X., Feng, X., Li, S., Chi, B., Wang, R., Xu, Z., Xu .** (2017). H . The microbe-secreted isopeptide poly- γ -glutamic acid induces stress tolerance in *Brassica napus* L. seedlings by activating crosstalk between H₂O₂ and Ca²⁺, *Scientific Reports*, 7 (1).
- Lopez De Leon, L., Caceres, I., Bornot, J., Choque, E., Raynal, J., Taillandier, P., Mathieu, F.** (2019). Influence of Culture Conditions on Production of NGPs by *Aspergillus tubingensis*. *J. Microbiol. Biotechnol*, 29(9), 1412–1423.
- Lowry,OH.,Rosebrough, NJ.,Farr,AL.,Randall,R.**(1951). Protein measurement with the colin phenoln reagent. *Biol Chem*, 193(1), 265-75.
- Maillard, J.** (2001). Le point sur l'Irrigation et la salinité des sols en zone aride: Risques et Recommandations. *Handicap International*, 35p.
- Mangal, A., Ndiaye, F., Sow1, H.A., Diop, T.A.** (2009). Influence du chlorure de sodium sur la croissance, la nutrition minérale et la mycorhization de *Acacia seyal*,*J .SCI.Technol*, 11 – 20.
- Mansour, M.** (2000). Nitrogen Containing Compounds and Adaptation of Plants to Salinity Stress. *Biologia Plantarum*, 43(4), 491-500.
- 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), 147–156.
- Mavi, M. S., Marschner, P., Chittleborough, D. J., Cox, J. W., Sanderman, J.** (2012). Salinity and sodicity affect soil respiration and dissolved organic matter dynamics differentially in soils varying in texture. *Soil Biology and Biochemistry*, 45, 8-13.
- Meenatchi, A.,Velmurugan, R.,Bagyalakshmi ,Rajendran, A.** (2016). Climatic dependency on the diversity and distribution of endophytic fungi from *Rauvolfia serpentina* of Westernghats. *International journal of Current Science Researche*, 2(2), 296-307.
- Meghnous, O.**(2020). Etude de l'aptitude des souches fongiques, isolées de la rhizosphère de deux plantes steppiques de la région minière d'Ain-Babouche, à la remédiation des sols métallifères. Thèse de doctorat : Biotechnologie et Bioprocédés, Applications Mycologiques. Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine 1, 192p.

- Meghnous, O., Dehimat, L., Doumas, P., Kassa-Laouar, M., Mosbah, F., et Rached, O.** (2019). Oxidative and antioxidative responses to antimony stress by endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* isolated from antimony accumulator *Hedysarum pallidum* Desf. *Biologia*, 74(12).
- Migdal, C., Serres M.** (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27(4), 405 - 412.
- Mindari, W., Sasongko, P. E., Kusuma, Z. Syekhfanis.** (2015). Characteristics of saline soil and effect of fertilizer application to rice yield. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, 6(1), 7-15.
- Mirhendi, H., Zarei F ., Motamedi, M.,Nouripour-Sisakht, S .**(2016). *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger* as the dominant black *Aspergillus*, use of simple PCR-RFLP for preliminary differentiation. 279(10), 8761-8.
- Mirsal, I.A.** (2008). Sources of Soil Pollution. In: Soil Pollution. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Montoroi, J.-P.** (2017). La salinisation des écosystèmes : De la dégradation insidieuse à la remédiation continue par les hommes. *Liaison Énergie-Francophonie*, (105), 67-69.
- Moud, A.M., Maghsoudi, K.** (2008). Salt stress effects on respiration and growth of germinated seeds of different wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *World J. Agric. Sci*, 4 (3), 351-358.
- Mougin, C.,Chaplan, V.,Rama-Mercier, R.,Sohier, L., Sigoillot, JC., Asther, M.** (1996).Utilisation des champignons filamenteux pour la dépollution de sols pollués par des polluants organiques. *Sciences et techniques*, (4), 20-22.
- Mukherjee, A., Das, D., Mondal, S.K., Biswas, R., Das, T.K., Boujedaini, N., KhudaBukhsh, A.R.** (2010). Tolerance of arsenate-induced stress in *Aspergillus niger*, a possible candidate for bioremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(2), 172-182.
- Munns, R.,Cramer, G R.,Ball, M. C.**(1999). Interaction between rising CO₂ ,soil salinity and growth ,Carbon dioxide and environmental stress. *London.Academic Press*, 139-167.
- Nagar, V. Sankhla, M. S., Aseri, V.** (2021). Major soil pollutants, sources, and toxic effects of Soil Pollution. *Khoj-An Interdisciplinary journal of reaserch*, 7 (2).
- Navarrete, C., Siles, A., MartÁñez, J. L., Calero, F., Ramos, J.** (2009). Oxidative stress sensitivity in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 9(4), 582-590.

- Noctor, G., Foyer, C.** (2011). Ascorbate And Glutathione: The Heart Of The Redox Hub. *Plant Physiology*, 155 (1), 2-18.
- Nxele, X., Klein, A., & Ndimba, B. K.** (2017). Drought and salinity stress alters ROS accumulation, water retention, and osmolyte content in sorghum plants. *South African journal of botany*, 108, 261-266.
- Parida, A., Das, A. B., Das, P.** (2002). NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins, and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. *Journal of Plant Biology*, 45(1), 28-36.
- Perron, K., Caille, O., Rossier, C., Van Delden, C., Dumas, J., Köhler, T.** (2004). CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonasaeruginosa*. *Biological chemistry*, 279(10), 8761–8768.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.-O.** (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4). 233–239.
- Pocsi, I., Prade, RA., Penninckx, M. J.** (2004). Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 49, 1-76.
- Porcel, R., Aroca, R., & Ruiz-Lozano, J. M.** (2012). Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(1), 181-200.
- Putnam, C.D., Arvai, A.S., Bourne, Y., Tainer, J.A.** (2000). Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol*, 296(1), 295-309.
- Raghad, S., Yolaine, D., Laure Vieublé, G., Leslie, M. S., Patricia, G., Wilfred, O., Philippe CB.** (2018). Pore-Scale Monitoring of the Effect of Microarchitecture on Fungal Growth in a Two-Dimensional Soil-Like Micromodel. *Frontiers in Environmental Science*, 6(68).
- Robert-Seilaniantz, A., Bari, R., Jones, J. D. G.** (2009). A Biotic or Abiotic Stress? In A. Pareek, S. K. Sopory, H. J. Bohnert (Éds.), *Abiotic Stress Adaptation in Plants*. Netherlands: Springer. 103-122.
- Shin, M.N., Shim, J., You, Y., Myung, H., Bang, K.S., Cho, M., Kamala-Kannan, S., Oha, B. T.** (2012). Characterization of lead resistant endophytic *Bacillus* sp. MN3-4 and its potential for promoting lead accumulation in metal hyperaccumulator *Alnus firma*. *J Hazard Mater.* (199–200), 314–320.

- Srivastava, P., Wu, Q.-S., Giri, B.** (2019). Salinity : An Overview. In B. Giri & A. Varma (Éds.), *Microorganisms in Saline Environments : Strategies and Functions*. Springer International Publishing. 3-18.
- Switala, J., Loewen, P.** (2002). Diversity of properties among catalases, *Arch Biochem Biophys*, 401(2), 145-54.
- Toledano, M. B., Delaunay, A., Biteau, B., Spector, D., & Azevedo, D.** (2003). Oxidative stress responses in yeast. In S. Hohmann & W. H. Mager (Éds.), *Yeast Stress Responses*. Berlin: Heidelberg Springer. 241-303.
- Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A.B.** (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci*, 151(1), 59-66.
- Waheed, A. A., Dahham, A. A., Azra, E. K., Kamal, J. A., Khaeim, H. M.** (2019). concentrations effect of some salts on growth of aspergillus niger and penicillium oxalicum. *Plant Archives*, 19, 310-312.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelhoven, R., Neumann, CH., Wettstein, D. V., Franken, P. H., Kogel, K. H.** (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(38), 13386-13391.
- Wang, M., Zhao, S., Wang, L., Chen, S., Li, S., Lei, X., Sun, X., Qin, L.** (2021). Salt stress-induced changes in microbial community structures and metabolic processes result in increased soil cadmium availability. *Science of The Total Environment*, 782(4).
- Xua, B., Kuo, Xua, L., Xiao-Long, Y., Guang-Wei, R., Xiao-Qiang, W., Wei L., Ning, D., Xiu-Fang, W., Peng, Z.** (2020). Characterization of diketopiperazine heterodimers as potential chemical markers for discrimination of two dominant black aspergilli, *Aspergillus niger* and *Aspergillus*. *Phytochemistry*, 176.
- Yingyun, C. H., Tenhui, H.U., Wei, X., Aili, F., Shaojie, W., Haijia, S.** (2021). Enhancing robustness of activated with *Aspergillus tubingensis* as a protective backbone structure under high-salinity stress. *Journal of Environmental Management*, 297.
- You, Y.H., Park, J.M., Lim, S.H., Kang, S.M., Park, J.H., Lee, I.J., Kim, J.G.** (2016). Gibberellin A7 production by *Aspergillus tubingensis* YH103 and cultural characteristics of endophytic fungi isolated from *Tetragonia tetragonoides* in Dokdo islands. *Korean J Microbiol*, 52(1), 32-39.

- Zhang, E.,Grob, P.,Yuan, H.,Tjian, R.** (2015). Architecture of the human XPC DNA repair and stem cell coactivator complex. *Biochimistry*, 112(48), 14817- 14822.
- Zhang, H.W., Song, Y.C. Tan, R.X.** (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, 23(5), 753-771.
- Zhang, N., Si, H.J., Wen, G., Du, H.H., Liu, B. L. Wang, D.** (2011). Enhanced drought and salinity tolerance in transgenic potato plants with a BADH gene from spinach. *Plant Biotechnology Reports*, 5(1), 71-77.
- Zhang, Q., & Wang, C.** (2020). Natural and Human Factors Affect the Distribution of Soil Heavy Metal Pollution : A Review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 231(7).



Annexes

Annexe1 : Les milieux de cultures**1-Milieu d'activation de la souche : PDA (*Potato Dextrose Agar*)**

-Pomme de terre.....	200g
-Glucose.....	15g
-Agar.....	20g
-L'eau distillée.....	1000ml

pH =6

2- Milieu YPD gélosé (tolérance à la salinité)

-Extrait de levure.....	10g
-Peptone.....	20g
-Glucose.....	20g
-Agar.....	20g

pH=6.4

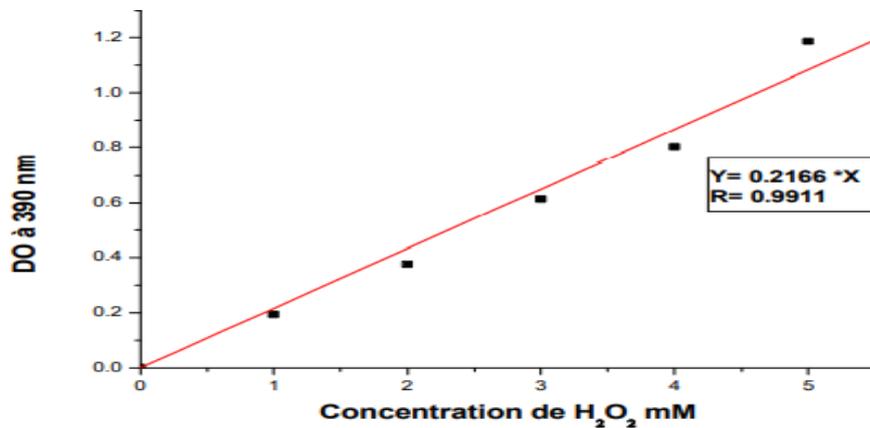
3-Milieu de fermentation : YPD tamponné

-Extrait de levure.....	10g
-Peptone.....	20g
-Glucose.....	20g
-Tampon phosphate de potassium50Mm.....	500ml

-pH= 6.4

Annexe 2: Dosages enzymatiques

1-Teneur en H₂ O₂



Courbe d'étalonnage de H₂O₂

Courbe d'étalonnage du peroxyde d'hydrogène (Meghnous, 2020)

2-Dosage des protéines totales

- Réactifs

Solution A : Na₂CO₃ à 2% dans le NaOH (0,1N) ;

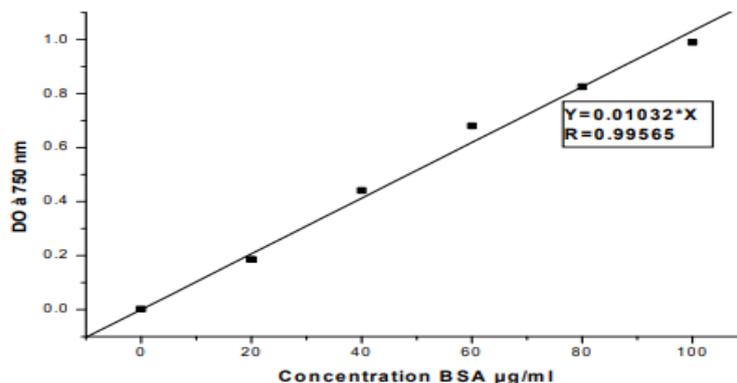
Solution B : CuSO₄, 5H₂O à 1% dans l'eau distillée ;

Solution C : Tartrate double de sodium et de potassium à 2% dans l'eau distillée ;

Solution M : 1 ml de solution C + 1 ml de solution B + 20 ml de solution A ; Réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10^{ème}.

- Protocole

A 1 ml de l'échantillon dilué, 2 ml de la solution M est ajouté. Le mélange est laissé reposer 10 à 15 min à température ambiante, ensuite 2 ml du réactif de Folin est ajouté. Après agitation vigoureuse, l'échantillon est incubé à température ambiante à l'obscurité pendant 45 min. L'absorbance est lue à 750nm.



Courbe d'étalonnage de BSA (Meghnous, 2020)

Annexe 3 : Appareillages



Appareil 1 : Autoclave



Appareil 2 : Bain-marie (memmert)



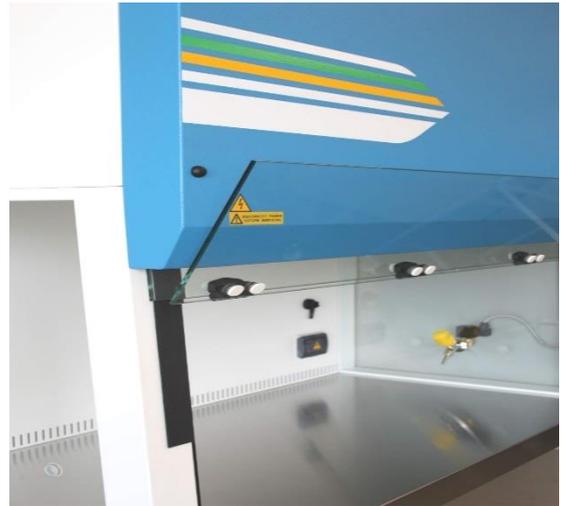
Appareil 3 : Balance de précision



Appareil 4 : Centrifugeuse (Sigma)



Appareil 5 : Etuve (*Memmert*)



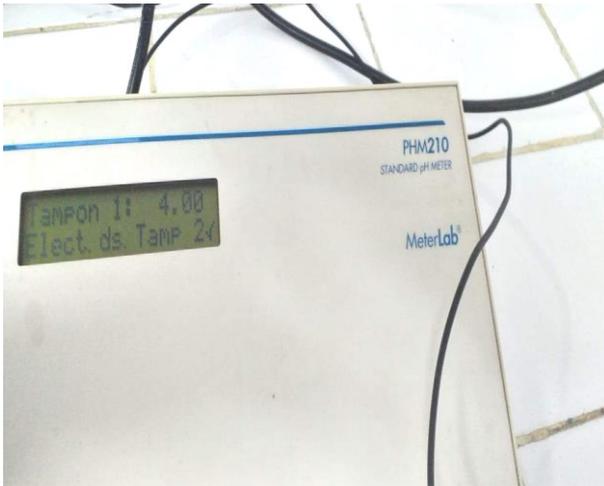
Appareil 6 : Hotte à flux laminaire (*FlowFastV*)



Appareil 7 : Incubateur rotatif (*NewBrunswick Scientific*)



Appareil 8 : Microscope optique (*Leica*)



Appareil 9 : pH mètre (*pHM210*
MeterLab)



Appareil 10 : pH mètre (*Mahito*
MODEL 903)



Appareil 11 : Plaque chauffante agitatrice
(*Fischer Scientific*)



Appareil 12 : Spectrophotomètre
(*JENWAY 6315 (OHAUS Explorer)*)

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : AYAT Chaima
DJERAFI Salima
MOUALDI Hadil Nour El Yakine

Impact du stress salin sur la réponse antioxydante d'*Aspergillus tubingensis*

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et Biotechnologie Fongique

Résumé : L'objectif de ce travail consiste à mettre en évidence *in vitro* l'impact de la salinité sur le mycoendophyte *Aspergillus tubingensis* qui présentait une résistance aux fortes concentrations aux sels de métaux lourds, et d'évaluer la stimulation du système de défense antioxydant pour neutraliser les radicaux libres induits par la présence des doses élevée de NaCl. *Aspergillus tubingensis* a montré une tolérance à l'excès de NaCl dans le milieu traduite par la bonne croissance même en doses élevées, notant une concentration minimale inhibitrice (CMI) à 20% de NaCl sur milieu YPD. L'hypersalinité a provoqué une augmentation significative de la teneur intracellulaire du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) avec sa teneur maximale 49.55mM. g⁻¹ ce qui a induit une réponse antioxydante traduite par des activités catalasiques importantes avec un maximum de 10.58μmol. min⁻¹. μg⁻¹prot. Ces résultats révèlent que la souche peut s'adapter à des concentrations élevées de NaCl, ce qui motive les biotechnologues à son utilisation comme bioremédiateur efficace pour développer une nouvelle stratégie de lutte contre la salinité des sols.

Mots-clefs : mycoendophyte, *Aspergillus tubingensis*, salinité, NaCl, stress oxydatif, antioxydants, bioremédiation

Laboratoires de recherche :

Laboratoire de Biologie Et Environnement (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadreur : MEGHNOUS Ouissem (MAB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : ABDELAZIZ Ouided (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : BOULAHROUF Khaled (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).