

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 : Biotechnologies

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

N° d'ordre :
N° de série :

Intitulé :

Impact du plomb sur la réponse antioxydante d'*Aspergillus sp.*

Présenté par : BOUKHANFOUF AYA ANFAL
HANNECHE CHIRAZ

Le 18/06/2023

Jury d'évaluation :

Président : LEGHLIMI HIND (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).
Encadreur : MEGHNOUS OUISSEM (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).
Examineur : ABDELAZIZ OUIDED (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire
2022 - 2023

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

Nous exprimons tout d'abord, nos profonds remerciements et louanges à DIEU tout puissant, qui nous a guidé sur le droit chemin et nous a donné le courage, la santé, la patience et la volonté d'achever ce travail.

Nous tenons à exprimer chaleureusement nos profonds remerciements et notre plus vive gratitude et reconnaissance à notre encadrante Docteur MEGHNOUS OUISSEM, Maître de conférence classe B à l'université des Frères Mentouri Constantine 1, qui a gentiment dirigé et surveillé le déroulement de ce travail, de nous avoir si bien encadré et orienté. Si aujourd'hui, nous sommes parvenues à compléter notre mémoire, c'est grâce à sa gentillesse, sa patience, sa disponibilité, ses précieux conseils dont on a pu bénéficier, et surtout ses encouragements tout au long de cette période, et sans ses efforts ce travail n'aurait pas pu être mené à la bonne voie.

Nous sommes infiniment ravies et honorées d'être sous votre supervision Docteur.

On tient à remercier aussi tous les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

A : Dr. LEGHLIMI HIND Maître de conférence classe A à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, qui nous fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

A : Dr. ABDELAZIZ OUIDED Maître de conférence classe B et chef de département de « Microbiologie » à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, qui a accepté d'examiner ce travail avec bienveillance.

Nous adressons nos sincères remerciements à l'ensemble du corps d'enseignement, depuis l'école primaire aux études supérieures pour toutes les connaissances qu'ils nous ont transmises.

*Nous tenons aussi à remercier l'ensemble des enseignants de la spécialité **Mycologie et Biotechnologie Fongique** pour avoir consacré leur temps et leur savoir-faire afin de nous faire bénéficier d'une meilleure formation.*

Enfin, on remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Louange à DIEU, le Tout Puissant, qui nous a permis de mener à bien ce modeste travail, c'est avec un très grand honneur que je dédie ce travail aux personnes les plus chères au monde :

A mon très cher papa « Djamel »

Aucune dédicace ne pourrait exprimer l'amour que j'ai toujours eu pour toi. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation. Je te souhaite une longue vie pleine de santé et de bonheur.

Je t'aime papa.

A ma très chère maman « Leïla »

Je te remercie pour toutes les nuits dans les quelles tu restais réveillée pour prendre Soins de moi. Merci pour ton sourire qui est la lanterne qui éclaire mon chemin, pour tous les moments de bonheur que tu m'apportes.

Rien ne pourra exprimer mon amour. Que dieu te garde et te protège.

Je t'aime maman.

A ma chère grand- mère : Sakina que j'aime très fort.

A mes très chères sœurs : Malak et Lara qui m'ont toujours aidé et conseillé, j'ai la chance de vous avoir dans ma vie.

A mes très chers frères : Raouf et Fehdou vous êtes la source de mes joies, et le support de ma vie.

A toute ma famille Hanneche et Khamar sans exception.

A mon binôme, ma très chère amie Anfel qui a passé avec moi tout un parcours plein de bons et de mauvais moments, merci pour tous les instants inoubliables, je t'adore ma belle...

A mes très chères copines, Imen, Raounek, Doria, Hadil, je vous aime énormément.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers :

*A mon père **Abdelkader**, mon support dans la vie, qui m'a appris et m'a toujours dirigé vers la gloire, pour tout ce qu'il a fait pour moi, par son soutien moral et ses encouragements.*

*Je t'aime **papa**, ma fierté.*

*A ma mère et mon unique sœur **Fouzia**, mon bonheur, ma source de tendresse, celle qui m'a arrosé l'espoir et le courage, qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que la volonté fait toujours les grands, pour les encouragements qu'elle m'a donné pendant mon parcours.*

*Je t'aime **mami**, ma vie.*

Que dieu le tout puissant les protège, les bénisse et leur accorde une longue vie.

*A mes très chers frères : **Aymen** et **Hayder**, qui savaient toujours comment procurer la joie et le sourire à ma vie, que Dieu leur offre le bonheur.*

*Mon merveilleux petit frère **Adib**, je lui souhaite une bonne chance et du succès dans ses études.*

*A ma chère sœur **Khadija**, je lui souhaite tout le bonheur de la vie.*

*A mes chères tantes **Hakima** et **Samira**, pour leur soutien moral.*

*A mes très chères cousines : **Sara** et son petit **Baraa**, **Lina**, **Intissar**, **Youssra** et mon adorable **Soumia**.*

*A mon très cher cousin **Sami**, qui n'a jamais cessé de m'aider et de m'épauler.*

*A **Chiraz**, ma chère sœur et amie avant d'être mon binôme pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce travail. Que Dieu la garde pour sa famille et toujours à mes côtés mon adorable partenaire.*

*A mes meilleures copines **Doria** et **Raounek**, pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble.*

A tous ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin, en particulier les administrateurs de la bibliothèque centrale de l'université des frères Mentouri Constantine 1.

*A tous mes collègues de la promotion **MBF** (2023).*

AYA ANFAL

Liste des abréviations

OH• : Radical hydroxyle

CAT : Catalase

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

ETM : Eléments traces métalliques

Fe²⁺ : Ion ferreux

Fe³⁺ : Ion ferrique

G/cm³ : Gramme par centimètre cube

G/mol : Gramme par mole

GPx : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion réduit

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

MDA : Malondialdéhyde

mg : Milli gramme

mg/kg : Milli gramme par kilo gramme

mM : Milli molaire

mM/g PF : Milli molaire par gramme de poids frais

mM/min/mg de prot : Milli molaire par minute par milli gramme de protéine

O₂^{•-}/O₂⁻ : Anion superoxyde

OH⁻ : Anion hydroxyle

Pb : Plomb

PbNO₂ : Nitrate de plomb

pH : Potentiel d'hydrogène

ROOH : Peroxyde d'hydrogène lipidique

SOD : Superoxyde dismutase

U/mg de prot : Unité enzymatique par milli gramme de protéine

µg/l : Microgramme par litre

Liste des figures

Figure 01 : Principaux flux des ETM dans le sol	4
Figure 02 : Cycle simplifié des ETM depuis les émissions jusqu'à l'exposition humaine ...	5
Figure 03 : Origines naturelles et anthropiques des ETM	6
Figure 04 : Plomb	9
Figure 05 : Diverses sources de la pollution par le plomb dans l'environnement	11
Figure 06 : Schématisation de la balance entre les ERO et les antioxydants	12
Figure 07 : Structures électroniques des espèces réactives communes de l'oxygène	13
Figure 08 : Attaque des métaux lourds sur une cellule et l'équilibre entre la production des ERO et la défense ultérieure présentée par les antioxydants	15
Figure 09 : Facteurs responsables à la bioremédiation	17
Figure 10 : Mycoremédiation	18
Figure 11 : Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes hôtes	20
Figure 12 : Champignons endophytes : classification et localisation dans la plante	21
Figure 13 : Structures des <i>Aspergillus</i>	28
Figure 14 : Variation du poids sec du mycélium d' <i>Aspergillus sp.</i> en fonction des différentes concentrations du Pb	34
Figure 15 : Teneur en H ₂ O ₂ chez <i>Aspergillus sp.</i> en fonction des concentrations du Pb	36
Figure 16 : Teneur intracellulaire en proline chez <i>Aspergillus sp.</i> en fonction des concentrations du Pb	37
Figure 17 : Activité de la CAT d' <i>Aspergillus sp.</i> en fonction des concentrations du Pb	38
Figure 18 : Teneur intracellulaire en proline chez <i>Aspergillus sp.</i> en fonction des concentrations du Pb	39

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification périodique des éléments	5
Tableau 02 : Principaux éléments métalliques essentiels et non-essentiels	8
Tableau 03 : Propriétés physico-chimiques du Plomb	10
Tableau 04 : Classification des endophytes fongiques	22

Résumé

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence *in vitro* la capacité de l'endophyte fongique *Aspergillus sp.* à tolérer des teneurs élevées du plomb et d'évaluer le niveau du stress oxydatif et la défense antioxydante qui jouent un rôle important dans la réponse écotoxicologique des microorganismes dans des environnements pollués. La mise en culture d'*Aspergillus sp.* dans le bouillon Sabouraud contenant différentes concentrations en Pb (0 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 0.75 mM, 1 mM), a permis de déterminer l'effet toxicogène du Pb, la mesure des teneurs intracellulaires en peroxyde d'hydrogène et en proline ainsi que les activités antioxydantes à savoir le superoxyde dismutase et la catalase. Les résultats obtenus montrent que l'effet toxique du plomb sur ce mycoendophyte s'est traduit par une diminution de sa biomasse fongique, tout en gardant 44% de cette biomasse à la plus haute concentration (1mM Pb), ceci confirme sa tolérance aux fortes doses du plomb. Tandis que pour les systèmes de défenses antioxydantes, les résultats révèlent qu'*Aspergillus sp.* présente des activités enzymatiques importantes (la superoxyde dismutase 8.8624 U/mg de prot et la catalase 9.922 mM/min/mg de prot) à 1 mM Pb, en neutralisant le peroxyde d'hydrogène. Les doses élevées en Pb ont généré l'accumulation du H₂O₂ où son taux maximal de 6.0163 mM/g de PF a été noté à 1 mM Pb, ceci a induit la stimulation de la synthèse de la proline atteignant une concentration de 9.9269 mM/g de PF en réponse au stress oxydatif, afin d'assurer la protection cellulaire contre les dommages causés par le H₂O₂. Ces résultats montrent qu'*Aspergillus sp.* a la capacité de réagir comme un agent de bioremédiation pour les sols pollués par le plomb.

Mots clés : Plomb, stress oxydatif, *Aspergillus sp.*, réponse antioxydante, bioremédiation.

Abstract

The objective of this study is to highlight *in vitro* the ability of the fungal endophyte *Aspergillus sp.* to tolerate high levels of lead and to evaluate the level of oxidative stress and antioxidant defense which play an important role in the ecotoxicological response of microorganisms in polluted environments. The cultivation of *Aspergillus sp.* in the Sabouraud broth containing different concentrations of Pb (0 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 0.75, mM, 1 mM), it was possible to determine the toxicogenic effect of Pb, the measurement of the intracellular contents of hydrogen peroxide and proline as well as the antioxidant activities, namely superoxide dismutase and catalase. The results obtained show that the toxic effect of lead on this mycoendophyte resulted in a decrease in its fungal biomass, while keeping 44% of this biomass at the highest concentration (1 mM Pb), this confirms its tolerance to high doses of lead. While for antioxidant defense systems, the results reveal that *Aspergillus sp.* exhibits important enzymatic activities (the superoxide dismutase 8.8624 U/mg of prot and the catalase 9.922 mM/min/mg of prot) at 1 mM Pb, by neutralizing hydrogen peroxide. The high doses in Pb generated the accumulation of H₂O₂ where its maximum level of 6.0163 mM /g of PF was noted at 1 mM Pb, this induced the stimulation of the synthesis of proline reaching a concentration of 9.9269 mM /g of PF in response to oxidative stress, in order to ensure cellular protection against damage caused by H₂O₂. These results show that *Aspergillus sp.* has the ability to react as a bioremediation agent for lead-polluted soils.

Key words : Lead, oxidative stress, *Aspergillus sp.*, antioxidant response, bioremediation.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تسليط الضوء في المختبر على قدرة الفطر الداخلي *Aspergillus sp.* لتحمل مستويات عالية من الرصاص وتقييم مستوى الإجهاد التأكسدي والدفاع المضاد للأكسدة الذي يلعب دورا مهما في الاستجابة السمية البيئية للكائنات الحية الدقيقة في البيئات الملوثة. زراعة *Aspergillus sp.* في وسط الزرع سابورو الذي يحتوي على تركيزات مختلفة من الرصاص (0 مم ، 0.25 مم ، 0.5 مم ، 0.75 مم ، 1 مم) ، لتحديد التأثير السام للرصاص ، وقياس مستويات بيروكسيد الهيدروجين والبرولين داخل الخلايا وكذلك الأنشطة المضادة للأكسدة ، وهي SOD وCAT. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن التأثير السام للرصاص على هذا الفطر أدى إلى انخفاض في الكتلة الحيوية الفطرية ، مع الحفاظ على 44 ٪ من هذه الكتلة الحيوية عند أعلى تركيز (1 مم Pb) ، وهذا يؤكد تحمله لجرعات عالية من الرصاص. بينما بالنسبة لأنظمة الدفاع المضادة للأكسدة، تكشف النتائج أن *Aspergillus sp.* يعرض أنشطة إنزيمية مهمة (ديسموتاز الأكسيد الفائق 8.8624 وحدة/مغ من البروت والكاتالاز 9.922 مم/دقيقة/مغ من البروت) عند 1 مم من Pb، عن طريق تحييد بيروكسيد الهيدروجين. الجرعات العالية في الرصاص ولدت تراكم H_2O_2 حيث لوحظ الحد الأقصى لمستواه 6.0163 مم غ/م من الوزن الصافي عند 1 مم من الرصاص ، مما أدى إلى تحفيز البرولين ليصل إلى تركيز 9.9269 مم / غ من الوزن الصافي استجابة للإجهاد التأكسدي ، من أجل ضمان الحماية الخلوية ضد الأضرار الناجمة عن H_2O_2 . تظهر هذه النتائج أن *Aspergillus sp.* لديه القدرة على التفاعل كعامل معالجة حيوية للتربة الملوثة بالرصاص.

الكلمات المفتاحية : الرصاص، الإجهاد الاكسدي، *Aspergillus sp.*، الاستجابة المضادة للأكسدة، المعالجة الحيوية.

Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des abréviations	
Liste des Figures	
Liste des tableaux	
Résumés	

Introduction	1
---------------------------	---

1. Revue bibliographique

Chapitre 1 : Les métaux lourds dans l'environnement

1. Pollution	3
2. Pollution des sols par les métaux lourds	3
3. Transfert des métaux lourds dans le sol	3
4. Métaux lourds	4
4.1. Origine des métaux lourds	6
4.1.1. Origine naturel	6
4.1.2. Origine anthropique	6
4.2. Types des métaux lourds	7
4.2.1. Métaux essentiels	7
4.2.2. Métaux non essentiels (toxiques)	7
4.3. Toxicité des métaux lourds	8
4.4. Plomb	9
4.4.1. Source du plomb	10
4.4.2. Toxicité du plomb	11
5. Métaux lourds et stress oxydatif	12
5.1. Stress oxydatif	12
5.2. Radicaux libres	12
5.2.1. Espèces Réactives de l'Oxygène [ERO]	13
5.3. Sources des ERO	14
5.4. Induction du stress oxydatif par les métaux lourds	15
5.5. Conséquences du stress oxydatif	15
5.5.1. Oxydation de l'ADN	15
5.5.2. Peroxydation des protéines	16
5.5.3. Peroxydation des lipides	16

Chapitre 2 : Bioremédiation par les champignons endophytes

1. Généralités sur la bioremédiation	17
2. Mycoremédiation	18
3. Techniques de la mycoremédiation	18
3.1. Biodégradation	18
3.2. Bioabsorption	19
3.3. Biocoverison	19
4. Champignons endophytes : généralités, définition, diversité, classification	19
5. Nature de l'interaction plante/champignon endophyte	22
6. Rôle des champignons endophytes	23
6.1. Résistance/tolérance des endophytes aux métaux lourds	23
7. Mécanismes de tolérance des endophytes fongiques aux métaux lourds	23
7.1. Immobilisation du métal	23
7.1.1. Biosorption du métal	23
7.1.2. Bioaccumulation	24
7.1.3. Précipitation des composés métalliques dans les hyphes	24
7.2. Biotransformation du métal	25
7.2.1. Oxydoréduction	25
7.2.2. Biométhylation	25
7.3. Solubilisation du métal	26
7.4. Biovolatilisation	26
8. <i>Aspergillus sp.</i>	27
8.1. Description	27
8.2. Classification	28
9. Rôle d' <i>Aspergillus sp.</i> au tant que bioremédiateur	28
10. <i>Aspergillus</i> source des antioxydants	29
11. Défense antioxydante	29
11.1. Défense anti-oxydante enzymatique	30
11.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)	30
11.1.2. Catalase (CAT)	30
11.1.3. Glutathion peroxydase (GPx)	31
11.2. Défense anti-oxydante non enzymatique	31
11.2.1. Glutathion réduit	31

11.2.2. Proline	32
11.2.3. Vitamine E et Vitamine C	32
2. Discussion des résultats	33
1. Introduction générale	33
2. Analyse et discussion des résultats	34
2.1 Impact du plomb sur la croissance de l'endophyte fongique <i>Aspergillus sp.</i>	34
2.2. Impact du plomb sur la teneur intracellulaire en H ₂ O ₂	35
2.3 Impact du plomb sur la teneur intracellulaire en proline	37
2.4 Impact du plomb sur l'activité de la SOD	38
2.5 Impact du plomb sur l'activité de la CAT	39
3. Conclusion et perspectives	41
4. Références bibliographiques	42
5. Annexe	

Introduction

La pollution des sols par les métaux lourds potentiellement toxiques constitue une préoccupation majeure, en raison des dangers provoqués par ces éléments chimiques persistants de nature non-biodégradables, en menaçant l'équilibre des écosystèmes, la biodiversité et la santé humaine (Jia et Rui, 2021).

Selon El Hachimi *et al.* (2014), l'exploitation minière est l'une des plus importantes sources de métaux lourds dans l'environnement. Les opérations d'extraction et de broyage minier, la concentration de minerais et l'évacuation de résidus, constituent des sources majeures de contamination de l'environnement. Par conséquent, des niveaux élevés de concentrations en métaux lourds peuvent être trouvés aux alentours des mines métallifères en raison de la décharge et la dispersion des déchets miniers dans les sols environnants, dans les cultures et les cours d'eau. Ils peuvent éventuellement présenter un risque potentiel pour la santé publique (Jung, 2001). De ce fait, la reconnaissance du danger des métaux lourds a conduit le développement de plusieurs stratégies de bioremédiation en exploitant les capacités métaboliques que possèdent les microorganismes, pour tolérer et remédier le stress oxydatif traduit par la génération des ERO en présence des métaux lourds (Jariyal *et al.*, 2020).

Les endophytes offrent un potentiel de bioremédiation (Deng et Cao, 2017), qui sont principalement les microorganismes, tels que des bactéries ou des champignons, qui vivent dans les tissus végétaux sans provoquer de maladie apparente et forment parfois des relations symbiotiques/mutualistes (Zhao *et al.*, 2016). Ces endoorganismes aident la plante à mieux s'adapter aux stress abiotiques et biotiques, en stimulant sa croissance et en réduisant les effets du stress sur la plante (Hodkinson *et al.*, 2019).

Dès lors, les champignons endophytes reçoivent plus d'attention en raison de la facilité de leur culture et leur forte biomasse mycélienne qui peut adsorber ou absorber fortement les métaux des environnements pollués.

Les champignons endophytes du genre *Aspergillus* sont des agents efficaces du processus de dépollution, car ils peuvent stimuler la synthèse des antioxydants enzymatiques comme la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT), ainsi que les non enzymatiques tel que la proline. Ces composés de défense antioxydants offrent la capacité aux champignons à s'adapter aux stress environnementaux (Bashir *et al.*, 2022).

Dans les sols qui entourent les déblais d'une ancienne mine du Nord-est algérien située à Oum el Bouaghi. Bentellis *et al.* (2014) ont mis en évidence des niveaux très élevés de divers métaux lourds principalement l'antimoine (21.4 mM), l'arsenic (6 mM), le plomb (0.7 mM) le cuivre (0.7 mM) et le zinc (5 mM). Ces mêmes auteurs ont rapporté que plusieurs espèces végétales dont principalement *Hedysarum pallidum* Desf. parviennent à se développer sur de tels substrats toxiques. Cette zone est caractérisée par sa végétation steppique à vocation pastorale, il existe donc une possibilité réelle d'une contamination de toutes ces plantes par les métaux lourds et d'un transfert et d'une concentration de ces derniers dans tous les maillons de la chaîne trophique (Bentellis *et al.*, 2014).

Pour répondre à cette problématique, nous suggérons que l'adaptation des plantes située dans un milieu fortement toxique comme celui-ci pourrait être liée à la présence d'une flore microbienne racinaire résistante, qui a acquis la capacité de piéger et neutraliser les espèces réactives de l'oxygène générées par la toxicité des éléments métalliques, afin de protéger les plantes hôtes contre le stress oxydatif.

L'objectif du présent travail est d'étudier les mécanismes de tolérance antioxydants d'*Aspergillus* à des concentrations croissantes de plomb (0.25 mM, 0.5 mM, 0.75 mM et 1 mM), ceci afin d'évaluer la capacité de ce champignon endophyte à dépolluer les sols contaminés par le Pb.

Ce travail est scindé en deux sections :

La première section, est une revue bibliographique qui rassemble des notions générales relatives à la pollution de l'environnement par les métaux lourds, le degré de toxicité de ces métaux et principalement le plomb, l'induction du stress oxydatif, ainsi que les mécanismes de tolérance et de résistance des champignons endophytes aux métaux lourds en remédiant les sols pollués.

La deuxième section, est consacrée à la discussion des résultats, permettant d'évaluer la thématique de la recherche.

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

Revue bibliographique

Chapitre 1 : **Les métaux lourds dans** **l'environnement**

1. Pollution

La pollution représente l'un des problèmes majeurs aux quels est confronté le monde, ce phénomène entraine une influence perturbatrice sur les différents compartiments de l'environnement (Ukaogo *et al.*, 2020).

La pollution est définie comme étant une altération et une modification défavorable d'un milieu environnemental (Ingrid, 2021), due à l'accumulation anormale d'éléments ou d'agents toxiques, susceptibles de porter atteinte à la qualité des écosystèmes aquatiques, terrestres et la santé humaine (Cachada *et al.*, 2018).

2. Pollution des sols par les métaux lourds

On parle de la pollution des sols par les métaux lourds, lorsque ces derniers sont présents à une dose constituant un danger pour l'activité biologique. Cette contamination affecte la fertilité des sols et menace la santé humaine (Bhat *et al.*, 2019 ; Jia et Rui, 2021).

La contamination des sols agricoles par les métaux lourds tels que le plomb (Pb), le cadmium (Cd), le zinc (Zn) et le cuivre (Cu) est une question de santé publique et de conservation de l'environnement (Janssen *et al.*, 2015 ; Tilwankar *et al.*, 2018). Les métaux lourds sont des substances non biodégradables et facilement bioaccumulables, qui peuvent donc persister dans le sol pendant de longues durées, dont certains d'entre eux sont toxiques pour les végétaux et les animaux y compris l'homme (Midhat *et al.*, 2022).

3. Transfert des métaux lourds dans le sol

Le transfert des métaux lourds dans le sol s'effectue après leur libération à partir des différentes sources naturelles ou anthropiques, ils se dispersent à travers tous les compartiments du milieu naturel y compris les espèces vivantes. Donc ils peuvent atteindre les eaux de surface ou souterraines *via* un transfert latéral ou vertical dans les sols (**figure 01**), ils peuvent être absorbés par les plantes, ainsi que par l'homme vu son contact avec tous les écosystèmes (Zhang *et al.*, 2018).

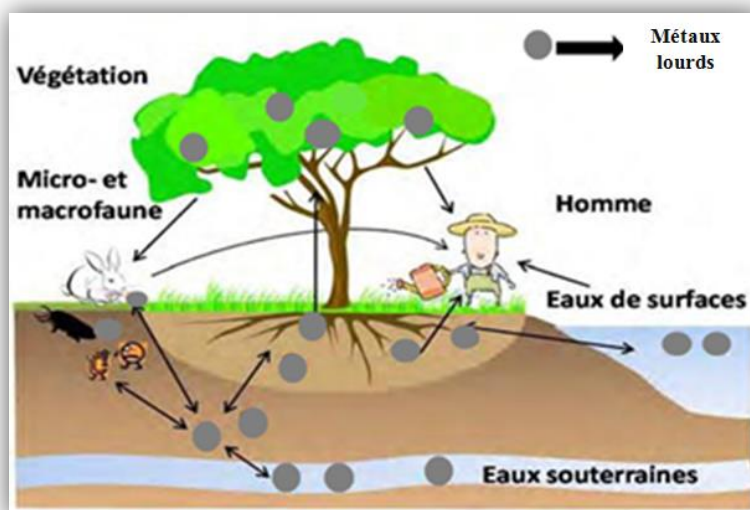


Figure 01 : Principaux flux des métaux lourds dans le sol (Lopavera-pohu, 2011)

Ce transfert dépend de différents facteurs, tels que la valence des métaux lourds, leurs interactions et associations avec les différents constituants du sol ainsi qu'aux propriétés physico-chimiques du sol comme le pH, les carbonates, la capacité d'échange cationique et les matières organiques (Antoniadis *et al.*, 2008).

4. Les métaux lourds

Les métaux lourds sont définis comme étant tout métal ayant une masse volumique supérieure à 5g/cm^3 (Ali et Khan, 2018 ; Alik *et al.*, 2021), les métaux lourds sont des composés inorganiques pouvant être présents naturellement en quantité très faibles dans les différents compartiments de l'environnement (Das *et al.*, 2014), c'est pour cette raison que les scientifiques les appellent « éléments traces métalliques (ETM) » (Nouri et Haddioui, 2016).

Certains métaux sont nécessaires et jouent un rôle important pour le métabolisme cellulaire tel que le cuivre (Cu), le fer (Fe), le nickel (Ni) et le manganèse (Mn). D'autre comme le plomb (Pb), le cadmium (Cd) et l'arsenic (As), n'ont aucun rôle bénéfique et sont toxiques pour les organismes vivants (Igiri *et al.*, 2018).

Les éléments du tableau périodique de Mendeleïev (**tableau 01**) qui forment des cations en solution se sont des métaux lourds (Nouri et Haddioui, 2016), ces derniers possèdent des propriétés chimiques et des fonctions biologiques très variables, ce qui différencie leur potentiel toxicogène sur les organismes vivants (Raikwar *et al.*, 2008).

Tableau 1 : Classification périodique des éléments (Zeggai, 2020)

TABLEAU PÉRIODIQUE DES ÉLÉMENTS

Ces éléments se caractérisent par un pouvoir toxique, une capacité à s'accumuler et persister durant de longues périodes, ainsi qu'ils sont non biodégradables (Uddin, 2017 ; Tilwankar *et al.*, 2018). En raison de cette dernière caractéristique, les métaux lourds pénètrent dans le sol, l'eau et contaminent par conséquent la chaîne alimentaire (Azimi *et al.*, 2017 ; Bhat *et al.*, 2019) (**figure 02**).

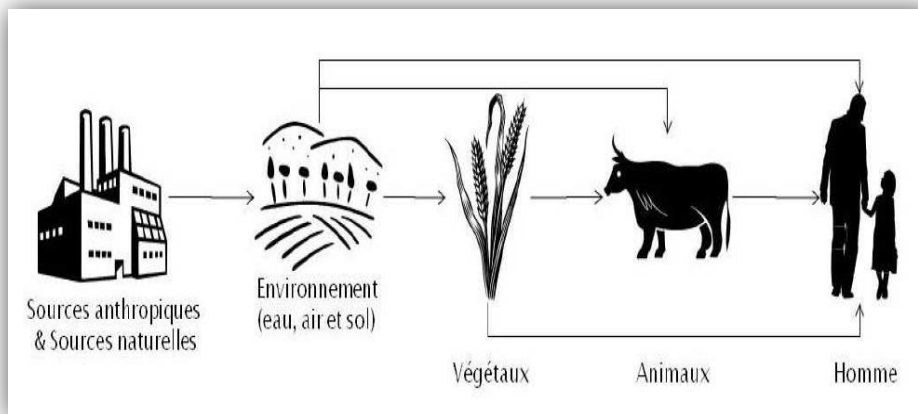


Figure 02 : Cycle simplifié des ETM depuis les émissions jusqu'à l'exposition humaine (Zeggai, 2020)

4.1. Origine des métaux lourds

Les métaux lourds sont des constituants naturels de tous les écosystèmes. Ils se trouvent dans l'atmosphère, l'hydrosphère, la lithosphère et la biosphère. Leur distribution dans l'environnement peut être naturelle ou anthropique (Rahman et Singh, 2019 ; Danial *et al.*, 2021) (**figure 03**).

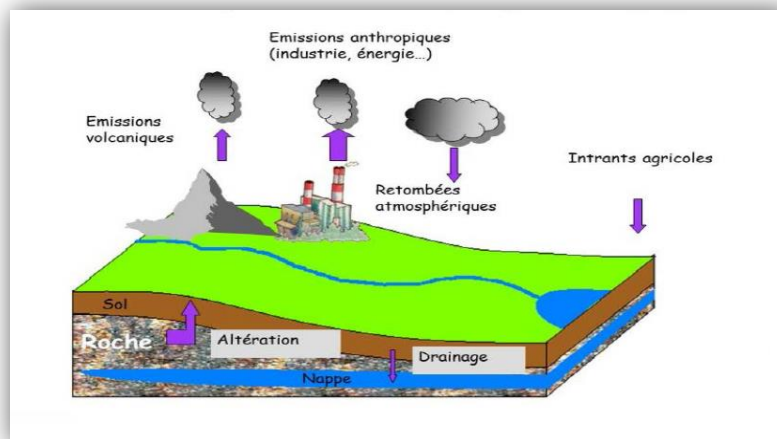


Figure 03 : Origines naturelles et anthropiques des ETM (Zeggai, 2020)

4.1.1. Origine naturelle

Les métaux lourds sont distribués naturellement dans tous les écosystèmes principalement par les processus géologiques et les cycles biologiques, en quantités très faibles. Les roches-mères sont la source principale des métaux lourds (Zhang et Wang, 2020), lors du processus d'altération, elles les libèrent pour créer le fond géochimique (Antibachi *et al.*, 2012).

Selon la nature de la roche, sa localisation et son âge que la concentration naturelle de ces métaux dans le sol peut se différencier (Aboubakar *et al.*, 2021). Ils sont introduits aux écosystèmes *via* les activités volcaniques, les altérations de la croûte terrestre, ou par les incendies des forêts (Meer *et al.*, 2020).

4.1.2. Origine anthropique

La source majeure de la contamination par les métaux lourds est d'origine anthropique (Li *et al.*, 2019), où certains écosystèmes atteignent des niveaux de concentrations allant au-delà des teneurs du fond naturel. Cette anomalie est due aux divers types d'activité

anthropique tels que : les activités agricoles, industrielles, pétrochimiques, minières et métallurgiques, ainsi que le transport et l'incinération des déchets (Tarekegn *et al.*, 2020).

Les métaux provenant d'apports anthropiques sont présents sous des formes chimiques assez réactives (Chu *et al.*, 2022), qui entraînent de ce fait des risques considérables par rapport aux métaux d'origine naturelle qui sont le plus souvent immobilisés sous des formes relativement inertes (Jiang *et al.*, 2019).

Ces sources provoquent l'accumulation des métaux dans les sols, ce qui va provoquer par la suite une menace pour la sécurité alimentaire et la santé publique, aussi des effets néfastes sur les écosystèmes aquatiques et terrestres. Le facteur de la solubilité de ces métaux détermine leur mobilité, leur biodisponibilité ainsi que leur toxicité, dont ces deux derniers dépendent de leur spéciation (Ali et Khan, 2018).

4.2. Types des métaux lourds

Les métaux rencontrés dans l'environnement peuvent être classés selon leur caractère essentiel ou toxique (Theron, 2012) (**tableau 02**).

4.2.1. Métaux essentiels

Les métaux essentiels sont des oligo-éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires. Ils se trouvent en proportions très faibles dans les tissus biologiques (Prashanth *et al.*, 2015), dont certains peuvent devenir toxiques lorsque la concentration dépasse un certain seuil, c'est le cas du Mn, du Ni, du Zn et du Fe (Rahman et Singh, 2019).

Par exemple le Zn est un oligo-élément qui intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques telles que les déshydrogénases, les protéinases et les peptidases, aussi le Mn qui joue un rôle important dans le système immunitaire et pour un métabolisme alimentaire efficace ainsi il aide à la coagulation du sang (Alzahrani *et al.*, 2016).

4.2.2. Métaux non essentiels (toxiques)

Les métaux non essentiels sont des éléments toxiques pour les organismes vivants, dont l'exposition excessive à eux peut entraîner des nuisances et des effets nuisibles même à de faibles concentrations (Cobbina *et al.*, 2015 ; Bhat *et al.*, 2019).

Ces micropolluants n'ont aucun rôle bénéfique connu pour la cellule, donc ils ne possèdent pas des fonctions métaboliques, ils sont considérés comme des polluants de l'environnement (Ali et Khan, 2018). C'est le cas du Pb, du Hg et du Cd, qui sont considérés comme des métaux lourds très dangereux et qui peuvent contaminer les milieux naturels et atteindre l'homme à travers la chaîne alimentaire (Aboubakar *et al.*, 2021).

Tableau 02 : Principaux éléments métalliques essentiels et non-essentiels (Djebrouni et Bouafia, 2020)

Éléments essentiels majeurs	Oligo-éléments essentiels	Éléments « essentiels » en ultra trace	Éléments non-essentiels
Calcium, Phosphore, Potassium, Soufre, Magnésium, Chlore, Sodium	Fer, Iode, Cuivre Manganèse, Zinc, Cobalt, Molybdène, Sélénium, Chrome, Nickel, Vanadium, Silicone, Arsenic	Lithium, Fluor, Aluminium, Étain, Plomb, (Cadmium)* *essentiel si déficit de Zinc	Cadmium, Mercure

4.3. Toxicité des métaux lourds

En général, la toxicité des métaux lourds pour les systèmes biologiques est due à la réactivité chimique de ces métaux avec toutes les particules organiques ou minérales porteuses d'une charge inversée par rapport au métal concerné dans le sol (Caporale et Violante, 2015).

Les organes cibles de la toxicité sont habituellement les organes qui accumulent les concentrations les plus élevées du métal, cela dépend souvent de la voie d'exposition et la spéciation du métal (Palaniappan et Karthikeyan, 2008). Chaque métal possède des caractéristiques uniques et des propriétés physico-chimiques qui lui confèrent des pouvoirs toxicologiques spécifiques (Singh et Kalamdhad, 2011).

Les métaux lourds ont un impact sur la population microbienne de diverses façons, dont les effets néfastes de ces éléments toxiques sur les microorganismes se résument en une diminution de la biomasse et la diversité microbienne, et par conséquent sur leurs activités cellulaires, métaboliques et enzymatiques (Singh et Kalamdhad, 2011).

Les métaux lourds affectent plusieurs processus morphologiques, physiologiques et biochimiques chez les plantes. Les effets visibles de la toxicité varient selon les espèces, mais les symptômes les plus communs sont les taches chlorotiques ou brunes sur les feuilles, les racines brunes et abimées et la diminution significative des rendements de récolte. D'autres effets moins visibles, tels que l'inhibition racinaire et la réduction de la photosynthèse (Singh et Kalamdhad, 2011).

4.4. Plomb

Le plomb est l'un des métaux lourds les plus abondants dans tous les compartiments de l'environnement, et le moins soluble dans le sol (Nowicka, 2022). C'est un métal caractérisé par son pouvoir hautement toxique même en faibles quantités, et aucun rôle bénéfique pour les organismes vivants n'a été rapporté (Verma et Dwivedi, 2013) (**figure 04**).

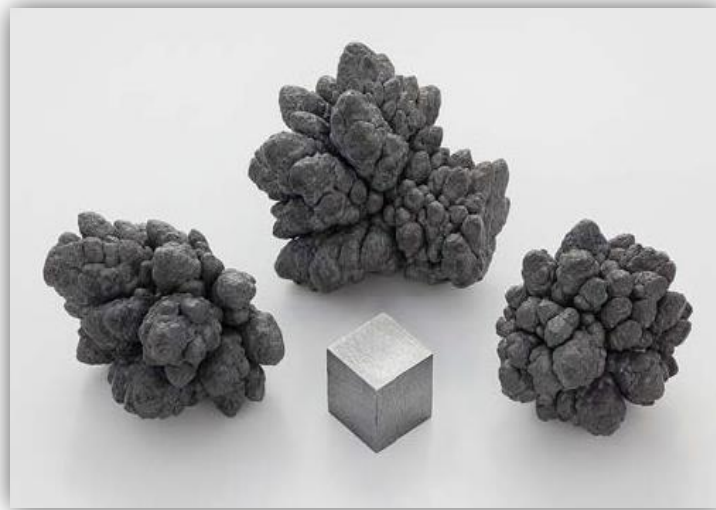


Figure 04 : Plomb (Zeggai, 2020)

La nomination du plomb provient du terme latin « *Plombum* », le plomb est un élément de symbole (Pb), qui fait partie du tableau périodique des éléments de Mendeleïev (Assi *et al.*, 2016). Il se caractérise par une couleur grise, malléable, sans goût ni odeur caractéristique et qui possède différentes propriétés physico-chimiques (Zhang *et al.*, 2015) (**tableau 03**). Il s'accumule dans l'environnement, et il est non biodégradable (Krzywy *et al.*, 2010).

Tableau 03 : Propriétés physico-chimiques du Plomb (Zeggai, 2020)

Symbole	Pb
Numéro atomique	82
Masse atomique	207,2 g/mol
Masse volumique	11,34 g/cm ³ à 20 °C
Isotope	4
Température de fusion	327 °C
Température d'ébullition	1755 °C

Le plomb existe sous deux formes, qui sont la forme organique et inorganique. Le plomb prend une forme inorganique lorsqu'il s'associe à certains composés pour former des sels de plomb, parmi les sels les plus fréquemment rencontrés, on retrouve ceux du chlorure, du chromate, du nitrate, de l'oxyde, du phosphate et du sulfate. Tandis-que le plomb organique, il se présente le plus souvent sous forme de plomb tétra-méthyle et de plomb tétra-éthyle, qui sont deux additifs utilisés pour augmenter l'indice d'octane dans l'essence (De francisco *et al*, 2003 ; Asrari, 2014).

4.4.1. Source du plomb

Les sources du plomb dans l'environnement peuvent être naturelles ou anthropiques (Rahman et Singh, 2019 ; Hernandez *et al.*, 2020) (**figure 05**).

Le plomb est un élément naturel présent dans la croûte terrestre et dans tous les compartiments de la biosphère (Elhamalawy, 2018). Dans l'atmosphère, les émissions du plomb proviennent de poussières volcaniques véhiculées par le vent (Patterson et Settle, 1987). Certains processus naturels, comme la dégradation du sol, l'érosion de la roche-mère et les feux de forêt, contribuent de façon significative à la libération du plomb. Mais généralement, ces processus ne conduisent que rarement à des concentrations élevées du plomb dans l'environnement (Kumar et Parasad, 2018).

Les émissions du plomb sont généralement anthropiques, ils proviennent des industries métallurgiques, du transport routier, des activités minières, des déchets industriels et de leurs incinérations (Nowicka, 2022).

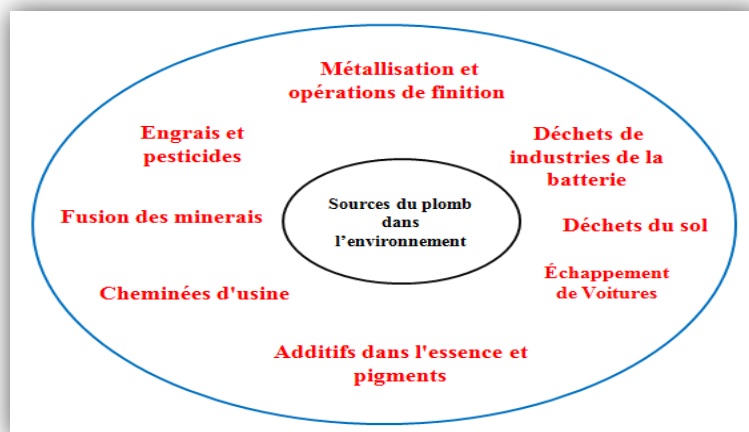


Figure 05 : Diverses sources de la pollution par le plomb dans l'environnement (Jaishankar *et al.*, 2014)

4.4.2. Toxicité du plomb

Le plomb est un élément chimique toxique, il possède un effet cumulatif pour l'homme, la faune et la flore (Elhamalawy, 2018).

En raison de son caractère toxicogène, l'organisation mondiale de la santé « OMS » précise que la concentration du plomb dans l'eau potable ne doit pas dépasser les 10 µg/l (Deshommes *et al.*, 2016).

Ce métal est un élément qui s'accumule dans les os et les tissus mous, et une exposition à des taux élevés en plomb peut notamment causer des maladies rénales, des maladies du sang, sur le système nerveux et des problèmes de reproduction. Tandis qu'une exposition chronique au plomb peut provoquer des problèmes cardiovasculaires pour l'être humain, il s'avère aussi cancérigène (Assi *et al.*, 2016).

Chez les végétaux, le plomb diminue la croissance des racines même s'il est présent en faibles concentrations, il affecte la germination des graines, les membranes cellulaires et certains systèmes enzymatiques perturbant le flux des électrons dans les chaînes de transfert, et par conséquent ces plantes deviennent épaisses, courtes et très enflées (Zulfiqar *et al.*, 2019).

5. Métaux lourds et stress oxydatif

5.1. Stress oxydatif

Le terme stress oxydatif ou bien stress oxydant fait référence à un déséquilibre de la balance oxydants/antioxydants (**figure 06**), c'est-à-dire un dysfonctionnement dans les systèmes de défense antioxydants pour piéger l'excès des espèces réactives de l'oxygène [ERO] produites lors d'un stress oxydatif (Sies, 2020).

Lorsque le potentiel antioxydant de l'organisme dépasse le taux de production des ERO l'organisme peut survivre, alors que si les quantités des ERO générées dépassent les capacités antioxydantes de l'organisme, le stress oxydatif aura lieu et la toxicité des ERO s'exprime envers de nombreux processus biologiques (Surai *et al.*, 2019).

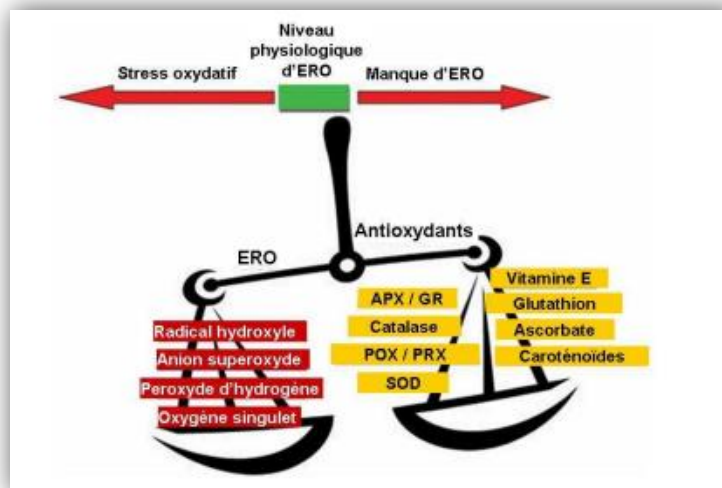


Figure 06 : Schématisation de la balance entre les ERO et les antioxydants (Bertrand, 2008)

5.2. Radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés dans leurs orbitaux externes (Jamdade et Bodare, 2023). Ces électrons libres sont exprimés par l'ajout du symbole \bullet dans la formule chimique des radicaux libres. Par exemple, le radical de l'anion superoxyde est noté $O_2^{\bullet-}$, et le *radical hydroxyle* $OH\bullet$ (**figure 07**). Ces molécules sont instables et capables de réagir rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir leur stabilité (Vidya *et al.*, 2022).

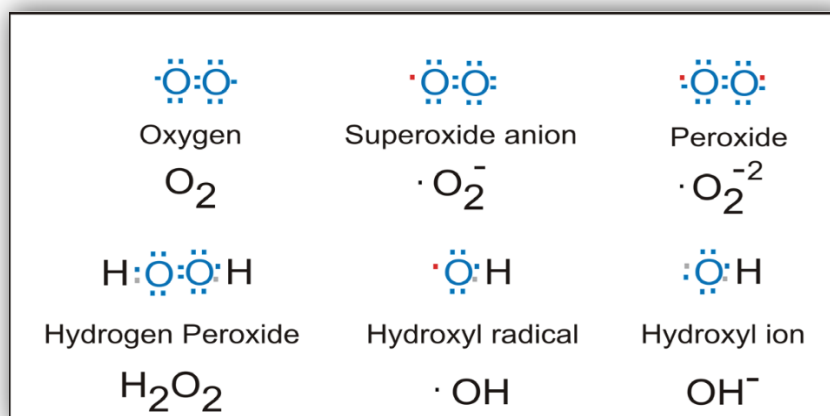


Figure 07 : Structures électroniques des espèces réactives communes de l'oxygène (Vidya *et al.*, 2022)

Une caractéristique importante des réactions induites par les radicaux libres est qu'ils ont tendance à se produire en réaction en chaîne (Pala et Tabakçioğlu, 2007), et cette dernière débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable autour de lui, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (Vidya *et al.*, 2022).

Les radicaux libres existent majoritairement sous deux grandes classes d'espèces réactives, les espèces réactives de l'azote « ERA », ainsi que les espèces réactives de l'oxygène « ERO », qui sont les plus répandus (Jamdade et Bodare, 2023).

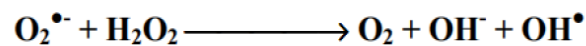
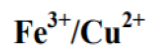
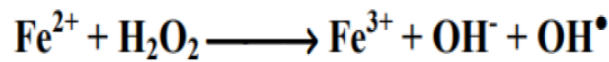
5.2.1. Espèces Réactives de l'Oxygène [ERO]

L'appellation espèces réactives de l'oxygène (ERO) fait référence aux radicaux libres issus de l'oxygène moléculaire où certains électrons se trouvent dans un état énergétique excité. Les ERO incluent les radicaux libres comme le radical de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le *radical hydroxyle* ($OH\cdot$) ainsi que des dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est légère comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Vidya *et al.*, 2022 ; Jamdade et Bodare, 2023).

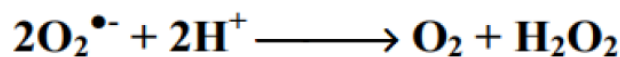
- **Anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) :** peut se former à partir du transfert d'un électron au dioxygène.



- **Radical hydroxyle (OH•)** : peut se former également de trois manières différentes, soit par la dégradation du H₂O₂ seul, ou lorsque ce dernier est lié au fer ferreux, ainsi que la réaction du H₂O₂ avec le radical superoxyde qui aboutit à la formation du radical OH•.



- **Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)** : la formation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) se fait par la dismutation spontanée ou enzymatique du radical superoxyde.



Les niveaux des ERO dans les systèmes biologiques dépendent non seulement de la productivité mais aussi de la présence et de l'activité des défenses antioxydantes cellulaires (Surai *et al.*, 2019), à des niveaux trop élevés, les ERO peuvent endommager les cellules vivantes en oxydant les protéines, les lipides et les acides nucléiques (Jamdade et Bodare, 2023).

5.3. Sources des ERO

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent se former au cours de nombreux processus tant endogènes qu'exogènes (Jamdade et Bodare, 2023).

Les principales sources des ERO intracellulaires sont : la chaîne respiratoire mitochondriale qui génère beaucoup plus l'O₂, elle est considérée comme une source majeure, ainsi que le réticulum endoplasmique, les cellules phagocytaires, les peroxysomes, les microsomes dans la membrane cellulaire, certaines enzymes comme les peroxydases et oxydases en plus des chloroplastes chez les plantes (Jamdade et Bodare, 2023).

Les sources exogènes peuvent être représentées par des facteurs environnementaux tels que la fumée du tabac, la pollution environnementale, les produits chimiques, les rayonnements, ainsi que les contaminations par les métaux lourds ou certaines carences nutritionnelles (Jamdade et Bodare, 2023).

5.4. Induction du stress oxydatif par les métaux lourds

La conséquence commune de l'empoisonnement des organismes vivants dans les conditions extrêmes, notamment, les métaux lourds est la production des ERO qui sont les principaux indicateurs du stress oxydatif (Wu *et al.*, 2016) (**figure 08**).

Les métaux de transition, ou métaux à potentiel redox actifs (tel que le Cu et le Fe), participent à la production des radicaux hydroxyles. Les métaux qui n'appartiennent pas aux métaux de transition (comme le Cd, Pb, Ni...) causent un déséquilibre métabolique, perturbant le potentiel antioxydant de la cellule et par conséquent augmentant la charge des ERO (Emamverdian *et al.*, 2015).

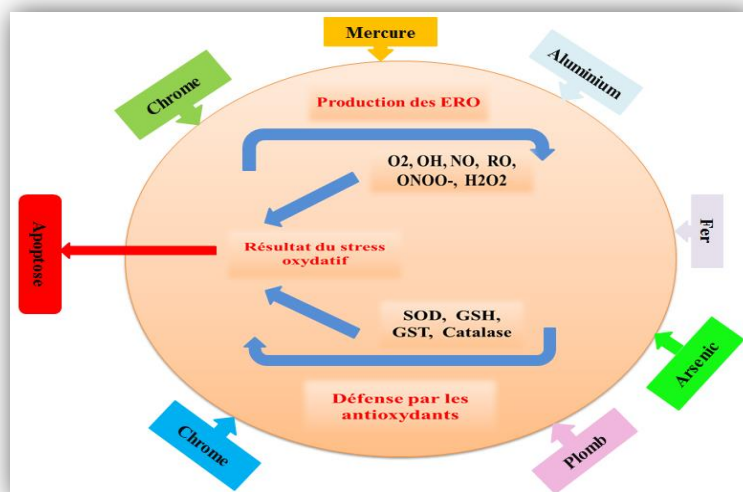


Figure 08 : Attaque des métaux lourds sur une cellule et l'équilibre entre la production des ERO et la défense ultérieure présentée par les antioxydants (Bhat *et al.*, 2019)

5.5. Conséquences du stress oxydatif

5.5.1. Oxydation de l'ADN

Les acides nucléiques sont très sensibles aux radicaux libres. Les altérations oxydatives causées par les ERO sont considérées comme la source majeure des dommages spontanés sur l'ADN. Ces dégâts affectent les bases nucléotidiques, en éliminant un nucléotide, aussi provoquent des ruptures dans l'un ou l'autre des brins d'ADN (Das et Roychoudhry, 2014).

Les ERO provoquent des erreurs de réplication et ils peuvent arrêter la transcription. Ces modifications aboutissent à des mutations génétiques affectant les gènes suppresseurs des tumeurs (Juan *et al.*, 2021).

5.5.2. Peroxydation des protéines

Les acides aminés peuvent être oxydés par l'action des ERO, dont les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane) sont les plus sensibles. Ces radicaux sont à l'origine d'une dégradation irréversible des protéines, par la formation des groupements carbonyles sur la chaîne latérale de certains acides aminés. Les dommages protéiques causés par les radicaux libres impliquent plusieurs réactions chimiques comme la fragmentation des chaînes de polypeptides et les changements de conformation des protéines (Vidya *et al.*, 2022).

Dans le cas d'enzymes, les modifications au niveau du site actif peuvent conduire à leur inactivation (Juan *et al.*, 2021).

5.5.3. Peroxydation des lipides

Les premières cibles des ERO sont les lipides, principalement ceux présents dans les membranes cellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Das et Roychoudhry, 2014).

La peroxydation des lipides provoque un changement de la fluidité, de la perméabilité des membranes, ainsi qu'elle implique la destruction des lipides membranaires, et des troubles métaboliques. Par conséquent, la peroxydation lipidique fournit une variété de produits, dont certains peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés on cite, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE) (Juan *et al.*, 2021).

Chapitre 2 :
Bioremédiation par les
champignons endophytes

1. Généralités sur la bioremédiation

Depuis les dernières décennies, la terre devient de plus en plus contaminée par des polluants toxiques, parmi eux les métaux lourds (Alkorta *et al.*, 2004). Pour pallier aux problèmes de contamination, de nouvelles techniques biologiques prometteuses ont été utilisées afin de préserver et dépolluer l'environnement notamment les propriétés du sol, dont la bioremédiation est l'une des principales approches biologiques récemment développées (Kour *et al.*, 2021).

La bioremédiation est l'ensemble de processus consistant à exploiter les diverses capacités métaboliques naturelles que possèdent de nombreux microorganismes (bactéries, champignons) pour décomposer et dégrader des polluants environnementaux toxiques en composés inertes, aboutissant à un environnement sain biologiquement (**figure 09**) (Jariyal *et al.*, 2020). Ces microorganismes peuvent être autochtones ou bien allochtones par rapport à la zone polluée (Rivelli *et al.*, 2012).

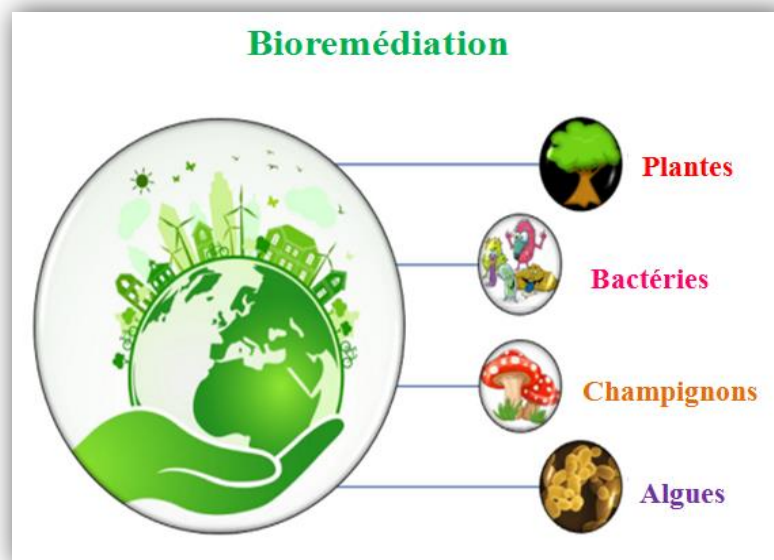


Figure 09 : Facteurs responsables à la bioremédiation (Jariyal *et al.*, 2020)

Cependant, le processus de bioremédiation est influencé par plusieurs facteurs tels que le type du microorganisme, le type du sol, le pH, la température, l'humidité, la capacité de rétention d'oxygène et d'eau (Karimi *et al.*, 2021).

2. Mycoremédiation

La mycoremédiation est un concept scientifique qui désigne l'ensemble des techniques utilisant des champignons dans le but d'épurer un environnement des polluants et d'éléments chimiques indésirables (**figure 10**) (Hamba et Tamiru, 2016). Cette technologie environnementale fait partie des techniques de bioremédiation, où les espèces fongiques sécrètent divers métabolites notamment les enzymes pour diminuer le taux de contaminants organiques dans le sol (Mani et Kumar, 2013).

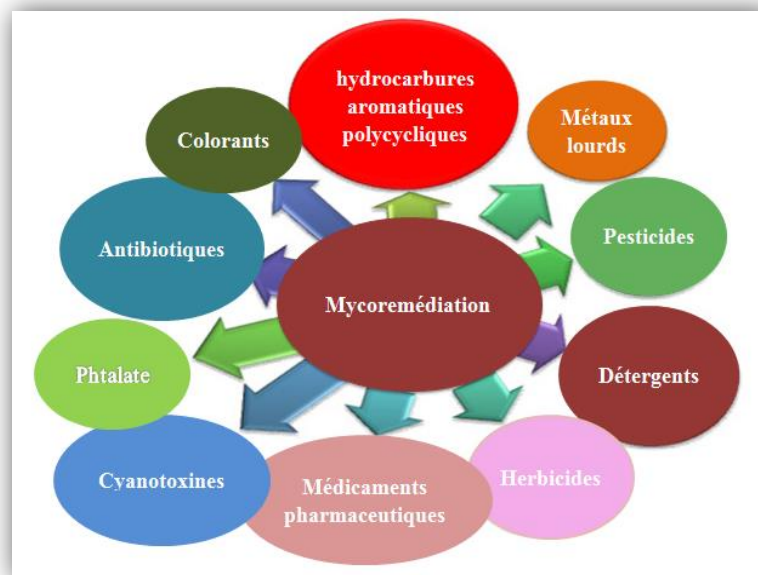


Figure 10 : Mycoremédiation (Akhtar et Mannan, 2020)

3. Techniques de la mycoremédiation

Les champignons utilisent différentes stratégies dans le but de remédier à la pollution de l'environnement, en appliquant souvent trois principales méthodes qui sont : la biodégradation, la bioabsorption et la bioconversion (Yadav *et al.*, 2021).

3.1. Biodégradation

Le processus de la biodégradation sert à une dépollution environnementale réalisée par des espèces fongiques qui ont la faculté de dégrader les substances organiques toxiques générées des sources naturelles ou des activités anthropiques en forme plus simple comme H_2O , CO_2 , NO_3 (Yadav *et al.*, 2021).

Cette dégradation est effectuée lors de la sécrétion de certains enzymes extracellulaires par les champignons responsables à ce processus, tels que les peroxydases, les ligninases, les cellulases, les pectinases, les xylanases et les oxydases (Kulshreshthe *et al.*, 2014).

3.2. Bioabsorption

La bioabsorption est un mécanisme important et efficace pour l'élimination des contaminants provenant d'un environnement pollué, par des champignons qui vont absorber ces contaminants tels que les ions métalliques, et les xénobiotiques à l'aide de leurs biomasses vivantes ou mortes (Thakur, 2018).

La bioabsorption implique une combinaison de deux processus qui sont : la bioaccumulation des polluants qui seront transportés dans la cellule puis séparés en composants intracellulaires, et la liaison de ces déchets à la biomasse sans le besoin d'une énergie métabolique (Barh *et al.*, 2019).

3.3. Bioconversion

La bioconversion est un procédé de recyclage des déchets industriels et agroindustriels, ces polluants ont la capacité à se convertir en substances utiles à hautes propriétés organoleptiques sous l'action de certaines espèces fongiques dans le cadre de résoudre le problème de gestion des déchets (Yadav *et al.*, 2021).

Les champignons jouent un rôle important dans la bioconversion des déchets car ils possèdent des propriétés et des mécanismes enzymatiques pour convertir des complexes organiques en formes plus simples, puis les utiliser comme substrat pour leur culture (Dhiman *et al.*, 2022).

4. Champignons endophytes : généralité, définition, diversité et classification

Le terme « endophyte » est issu du grec : « *endo* » ou « *endon* » signifiant à l'intérieur, et « *phytes* » ou « *phyton* » désignant « plante ». Les champignons endophytes sont définis comme étant des microorganismes, vivant, colonisant et envahissant les tissus sains des plantes internes, distinctes des épiphytes qui vivent sur la surface des plantes. Cette colonisation dure pendant toute ou une partie de leur cycle de vie (De Carvalho *et al.*, 2020 ; Daulagala, 2021).

Les endophytes fongiques sont hétérotrophes et extrêmement ubiquitaires (Paiva *et al.*, 2022), au sens large ce sont des champignons qui se reproduisent au sein de la plante hôte (dans le milieu intracellulaire ou intercellulaire) en tirant leur énergie à partir d'elle sans l'endommager (Reis *et al.*, 2022) (**figure 11**).

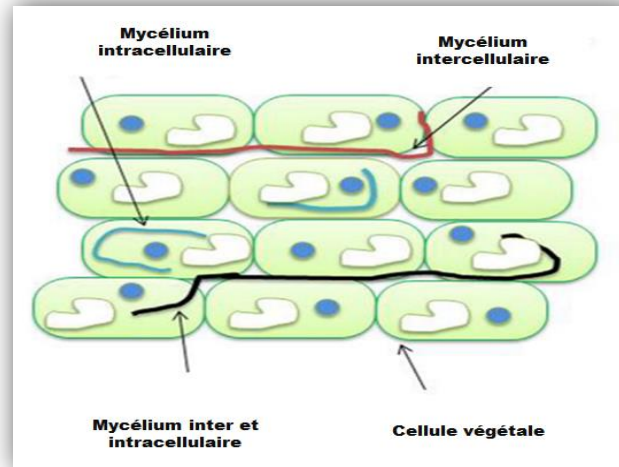


Figure 11 : Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes hôtes
(Kumar *et al.*, 2021)

Plusieurs études mettent en évidence l'importance des champignons endophytes en raison de leur large diversité et les bénéfices apportés à la plante l'hôte. Toutes les espèces végétales semblent avoir une association avec les endophytes dans les écosystèmes naturels, cette association est le plus souvent mutualiste (Baron et Rigobelo, 2022).

Les variations géographiques et les conditions climatiques sont des facteurs qui contribuent le plus souvent à la diversité des champignons endophytes. Dans ce contexte les endophytes semblent être plus divers dans les zones tropicales que dans les zones tempérées ou froides du monde (Baron et Rigobelo, 2022).

L'âge de la plante hôte influe aussi sur la diversité des champignons endophytes, il apparaît que les plantes âgées hébergent plus d'endophytes dans leurs tissus que les plantes jeunes (Grabka *et al.*, 2022). Ces champignons endophytes forment un groupe très diversifié polyphylétique, dont les espèces appartiennent principalement au phylum Ascomycota, aussi il existe certains taxons des Basidiomycota, Glomeromycota et Zygomycota (Ogbe *et al.*, 2020).

Sur la base de leur colonisation des tissus, leur diversité, les bénéfices qu'offrent pour les plantes hôtes et leur mode de transmission spécifique, les endophytes fongiques, peuvent être classés en deux groupes majeurs : les Clavicipitaceae (C-endophytes) et les Non-Clavicipitaceae (NC-endophytes) (Baron et Rigobelo, 2022) (**figure 12**).

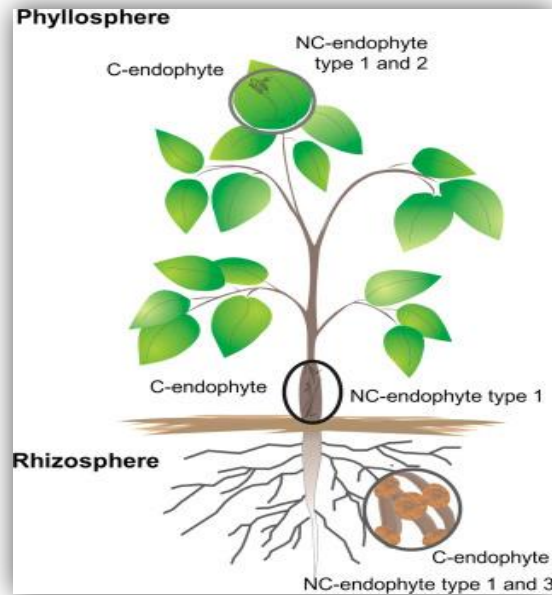


Figure 12 : Champignons endophytes : classification et localisation dans la plante (De Carvalho *et al.*, 2020)

Les champignons appartenant au groupe des Clavicipitaceae infectent certaines plantes, en restant endophytes tout au long du cycle de vie de l'hôte. La croissance de ces champignons se manifeste généralement dans les méristèmes de la plante l'hôte et au niveau des rhizomes, ils sont souvent transmis verticalement, tandis qu'ils ont le pouvoir de prolonger la survie de leurs hôtes par de nombreux processus métaboliques (Blaszczyk *et al.*, 2021).

Les champignons du groupe Non-Clavicipitaceae ne restent pas endophytes tout au long du cycle de vie de l'hôte, leur transmission s'effectue principalement par un axe horizontal, ce groupe d'endophyte inclus les Ascomycota, en site donc les *Aspergillus*. La majorité des plantes sur terre hébergent ce type de champignons. Ces derniers confèrent à leurs hôtes des bénéfices potentiels incluant la tolérance à la sécheresse, l'antagonisme envers les organismes phytopathogènes, la protection des hôtes contre les herbivores, et autres types de stress (Naik, 2019).

Cependant il existe une autre classification des champignons endophytes, dont les deux groupes majeurs se subdivisent en quatre classes (Baron et Rigobelo, 2022) (**tableau 04**).

Tableau 04 : Classification des endophytes fongiques (Belazouz, 2020)

	Clavicipitaceae	Non-clavicipitaceae		
Critères	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Gamme d'hôtes	Etroit	Vaste	Vaste	Vaste
Tissus colonisé	Tiges, racines et rhizomes	Tiges, racines et rhizomes	Tiges	Racines
Colonisation des plantes	Extensive	Extensive	Limitée	Extensive
Transmission	V/H	V/H	H	H
Bénéfice physique	NAH	NAH/AH	NAH	NAH

-Non adapté à l'habitat (NAH) : des avantages tels que la tolérance à la sécheresse et l'accélération de la croissance sont courants chez les endophytes, quel que soit leur habitat d'origine.

-Adapté à l'habitat (AH) : les avantages résultent de pressions de sélection spécifiques à l'habitat telles que le pH, la température et la salinité.

-V : verticale / -H : horizontale

5. Nature de l'interaction plante/champignon endophyte

Les plantes généralement créent des interactions avec les champignons endophytes, allant de mutualistes ou symbiotiques à antagonistes ou légèrement pathogènes (Kumar *et al.*, 2021).

Les bénéfices apportés par les champignons endophytes mutualistes à leurs plantes hôtes peuvent avoir différents aspects, les endophytes fongiques sont connus par leur capacité de produire toute une gamme d'hormones dans le but d'améliorer la croissance de leurs plantes hôtes, en stimulant le système de défense des plantes hôtes contre les divers agents pathogènes, de plus, les champignons endophytes ont le pouvoir de produire différents composés bioactifs en augmentant la résistance de l'hôte vis-à-vis le stress biotique et abiotique (Yan *et al.*, 2019 ; Adeleke *et al.*, 2022).

6. Rôle des champignons endophytes

Selon les études de Meghnous (2020), les endophytes fongiques peuvent fournir plusieurs bénéfices aux plantes, on cite la production des métabolites secondaires pour agir contre les agents pathogènes, la protection contre les insectes ravageurs, ainsi que ces endophytes stimulent la croissance végétale en améliorant par exemple la photosynthèse, aussi qu'ils peuvent augmenter la tolérance de l'hôte aux stress abiotiques tels que la sécheresse, les métaux lourds, les températures élevées et la salinité.

6.1. Résistance/tolérance des endophytes aux métaux lourds

La présence des ions métalliques et même ceux qui sont essentiels en fortes teneurs dans les milieux naturels, entraîne une pollution de ces milieux, ceci va influencer négativement sur tous les organismes vivants y compris les champignons qui font partie de la flore microbienne du milieu, dont les espèces fongiques révèlent une très grande tolérance vis-à-vis les métaux lourds, en citant parmi eux les *Aspergillus* (Priya *et al.*, 2022).

Pour que cette flore microbienne survive dans un milieu toxique, elle doit développer plusieurs mécanismes et processus cellulaires pour faire face à ce type de stress métallique. Cette capacité revient principalement à leurs propriétés biochimiques, structurales intrinsèques, ainsi que de leur adaptabilité physiologique et/ou génétique. C'est ce qu'on appelle les mécanismes de résistance et de tolérance et qui sont exploités en bioremédiation (Priya *et al.*, 2022).

7. Mécanismes de tolérance des endophytes fongiques aux métaux lourds

7.1. Immobilisation du métal

Les champignons ont le pouvoir d'agir comme des récepteurs d'ions toxiques par absorption, accumulation ou en le précipitant sur les hyphes (Kumar et Dwivedi, 2021).

7.1.1. Biosorption du métal

Les champignons sont connus d'être efficaces pour éliminer les métaux toxiques par la biosorption, en raison de leur paroi constituée d'une série de polymères glucidiques comme la chitine, le chitosane et les glycanes, portant des groupements anioniques qui seront fixés avec les cations métalliques résultant de l'association entre les deux (Kumar et Dwivedi, 2021).

Les mélanines sont des pigments fongiques importants puisqu'ils participent à la survie des mycètes en réponse aux stress environnementaux. Ces pigments sont extracellulaires, synthétisés et localisés à l'extérieur des cellules, ils sont caractérisés par la sécrétion de phénoloxydases oxydant les composés phénoliques. Ces derniers et les mélanines possèdent de nombreux sites actifs de fixation des métaux (Kumar et Dwivedi, 2021).

La biosorption des métaux lourds par les champignons se fait en fonction de leurs besoins nutritifs, elle est conditionnée par de nombreux facteurs physico-chimiques tels que le pH, la température, ainsi que la nature des cations et des anions (Kumar et Dwivedi, 2021).

7.1.2. Bioaccumulation

Le processus de bioaccumulation désigne la capacité des organismes vivants à absorber des oligoéléments nécessaires à leur croissance, ou même des éléments toxiques indésirables, puis les concentrer dans une partie de leurs corps ou dans tout l'organisme. La bioaccumulation des métaux lourds se termine avec une forte concentration de ces éléments dans l'organisme accumulateur, tandis qu'elle serait moins faible dans le biotope de cet organisme (Tarekegn *et al.*, 2020).

Les champignons tels que les *Aspergillus* sont des excellents bioaccumulateurs d'éléments toxiques, impliquant deux étapes successives. Le processus de bioaccumulation des métaux lourds commence d'abord par une biosorption, par les liens entre les ions métalliques et les groupements fonctionnels de la paroi cellulaire des mycètes. Pour la deuxième étape, sera un transport des métaux à travers la membrane cellulaire, ce transfert s'effectue de la même manière que celui des ions métalliques essentiels, tel que le potassium, magnésium et sodium (Hansda *et al.*, 2016).

7.1.3. Précipitation des composés métalliques sur les hyphes

La précipitation des métaux lourds par les mycètes est définie comme le passage des métaux de l'état dissout à l'état solide, ces derniers se précipitent sous une forme amorphe et cristalline, aussi sous forme d'hydroxyde, de carbonates, de phosphates ou de sulfures. Ce processus peut être réalisé par des cellules vivantes ou mortes. La précipitation se termine généralement par des précipitas métalliques liés aux cellules fongiques, et la stabilité de ces bioprécipitas est liée au pH, au potentiel redox, et à d'autres conditions environnementales (Sun *et al.*, 2021).

7.2. Biotransformation du métal

Les champignons, ainsi que les bactéries possèdent le pouvoir de transformer et neutraliser les métaux lourds à des éléments moins toxiques ou bien volatiles carrément, en changeant la spéciation et la mobilité de ces métaux. Cette transformation chimique s'effectue par oxydation, réduction ou méthylation (Tarekegn *et al.*, 2020).

7.2.1. Oxydoréduction

Les microorganismes spécialement les champignons, peuvent agir directement sur les éléments toxiques par le processus d'oxydoréduction. L'élément devient alors donneur ou accepteur d'électron, et qui sera par la suite précipiter sur les hyphes fongiques. Ces réactions visent principalement à protéger les mycètes de la toxicité des métaux, elles sont donc spécifiques à un microorganisme donné (Rahman et Singh, 2020).

De plus, la modification du degré d'oxydation des ligands qui s'associent avec le métal influence indirectement la solubilité de ce dernier. Par exemple, en conditions réductrices, les sulfates sont réduits en sulfure en piégeant les éléments métalliques tels que le Pb, Cd et Zn (Rahman et Singh, 2020).

7.2.2. Biométhylation

La biométhylation est une réaction chimique, qui désigne le transfert d'un groupement méthyle à partir d'un donneur vers un métal lourd, qui a la capacité d'acquérir ce groupement, grâce à une enzyme appelée la méthyltransférase, entraînant fréquemment une altération de la volatilité, la solubilité, la toxicité, et de la mobilité de ces éléments. Les principaux agents méthylants sont la méthylcobalamine impliquée dans la méthylation du Hg et le S- adénosylméthionine impliquée dans la méthylation de l'As et le Se (Seshadri *et al.*, 2015).

Les facteurs qui influencent la biométhylation des éléments sont ceux qui influencent l'activité microbienne, comme la matière organique, la température, l'humidité, le pH et la teneur en oxygène du milieu. La méthylation des métaux lourds peut être considérée comme un mécanisme de détoxification, car ces métaux seront par la suite des substances ou ce qu'on appelle des dérivés méthylés, éliminés par volatilisation (Seshadri *et al.*, 2015).

7.3. Solubilisation du métal

La solubilisation des composés métalliques toxiques est un aspect important observé chez les champignons, qui sert principalement à la production des protons (ion H^+) et des complexes organiques (composés acides) tels que les acides carboxyliques, phénoliques, aliphatiques, nitriques et sulfuriques, rejetés dans le sol par les espèces fongiques responsables à ce processus. La tolérance aux métaux toxiques, et la capacité à les solubiliser varie d'une espèce fongique à une autre (Pathak *et al.*, 2021).

Selon Pathak *et al.* (2021), la solubilisation fongique des métaux se produit par plusieurs mécanismes comprenant :

- L'acidolyse (La solubilisation des métaux s'effectue lorsque l'oxygène de ces derniers est protoné par la dissociation d'un acide).
- La complexolyse (les anions des acides organiques forment des complexes avec les cations des métaux. Une telle complexion dépend des concentrations relatives des anions, des métaux et même le pH).
- La redoxolyse (par exemple, la solubilisation du manganèse est produite suite à une réduction enzymatique des minéraux de manganèse oxydés).
- La bioaccumulation s'effectue sans l'intervention des métabolites fongiques, au contraire elle aura lieu grâce aux groupes fonctionnels de la paroi fongique, donc le mycélium fonctionne comme un lien, il va capturer ou emprisonner les ions métalliques.

Les trois premiers mécanismes se produisent lorsque les champignons secrètent les acides organiques. Par contre le quatrième processus peut être observé si les champignons accumulent des ions métalliques, en causant leur solubilisation continue par la perturbation de l'équilibre entre leur forme solide et dissoute (Pathak *et al.*, 2021).

7.4. Biovolatilisation

La biovolatilisation est basée sur l'effet enzymatique direct de certains champignons sur le degré d'oxydation des éléments métalliques. C'est le cas du mercure, l'arsenic, sélénium et l'antimoine. D'autres métaux lourds peuvent devenir volatiles grâce à leur acquisition d'un groupement méthyle tel que Pb, Sn, As, Sb et Se (Tarfeen *et al.*, 2022).

Par exemple, le cas d'arsenic dans le sol qui peut être converti en dérivés volatils par la flore fongique, donc cette dernière est responsable à la production des arsenicaux volatils. La quantité d'arsenic volatilisé par les champignons est régie par de nombreux facteurs tels que les formes d'arsenic et sa concentration, l'humidité du sol, la température, la matière organique, la croissance fongique et la capacité de volatilisation de l'arsenic lui-même (Verma *et al.*, 2019).

8. *Aspergillus sp.*

Les endophytes du genre *Aspergillus* sont des champignons cosmopolites très répandus dans les tissus des végétaux. Plusieurs études rapportent qu'*Aspergillus* colonisent les plantes notamment *Hedysarum pallidum* Desf. et *Lygeum spartum* L. (Meghnous, 2020 ; Terna *et al.*, 2021). Ces *Aspergillus* endophytes ont un rôle écologique primordial grâce à leur large distribution ainsi que leur taux de colonisation des différents tissus végétaux très élevé (Meghnous, 2020).

Certaines espèces du genre *Aspergillus* sont considérées comme une source très importante de métabolites secondaires à grande valeur biologique, ainsi qu'elles ont la capacité de produire des composés phytochimiques spécifiques à l'hôte résultant de la recombinaison génétique entre la souche fongique et sa plante hôte, ces composés font une alternative à ceux produits principalement par la plante (El-hawary *et al.*, 2020).

Ce genre fait partie des endophytes fongiques les plus répandus comprenant plusieurs espèces, tel qu'*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus oryzae* et *Aspergillus versicolor* (Hagag *et al.*, 2022).

8.1. Description

Les champignons du genre *Aspergillus* sont des moisissures, autrement dit des champignons microscopiques filamenteux. L'ensemble des filaments (ou hyphes) constituent le mycélium (Amara et Abd el-baky, 2023). La plupart des *Aspergillus* se reproduisent de façon asexuée, mais il existe d'autres espèces qui se reproduisent de façon sexuée (Cho *et al.*, 2022).

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un thalle végétatif formé de filaments ramifiés, hyalins et cloisonnés. Sur les filaments végétatifs se trouvent des filaments dressés, non cloisonnés, appelés les conidiophores, qui se terminent par une vésicule sur laquelle sont disposées les phialides (Emmanuel et Igoche, 2022) (**figure 13**).

L'identification du genre *Aspergillus* reposera sur la mise en évidence des têtes aspergillaires à l'examen microscopique des colonies (Saif *et al.*, 2021).

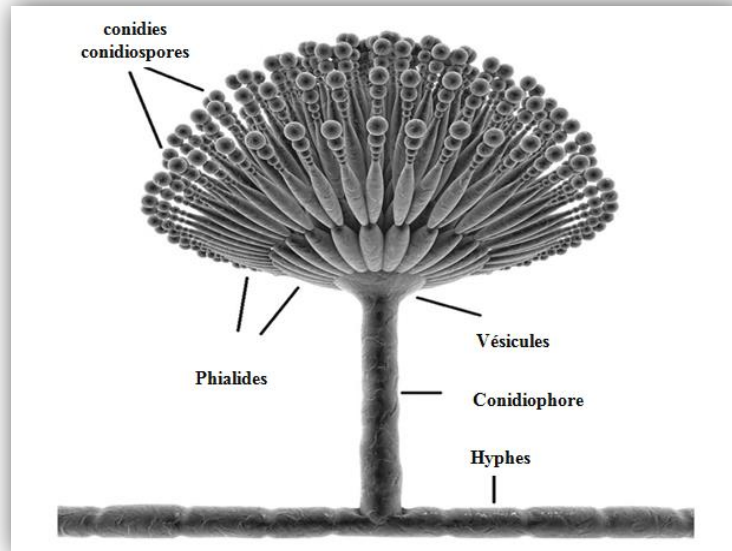


Figure 13 : Structure des *Aspergillus* (Quereshi *et al.*, 2016)

8.2. Classification

Selon Makhoul, (2019) la classification du genre *Aspergillus* est la suivante :

Règne : Fungi

Embranchement : Ascomycota

Sous-embranchement : Deuteromycotina

Classe : Eurotiomycètes

Ordre : Eurotiales

Famille : Trichocomaceae

Genre : *Aspergillus*

9. Rôle d'*Aspergillus sp.* au tant que bioremédiateur

Les champignons sont connus par leur potentiel de bioremédiation, ils sont considérés comme agents potentiels palliatifs aux problèmes de pollution environnementale vu leur capacité à dégrader différents polluants et déchets, comme exemple le plastique, les déchets agrochimiques, ainsi que les hydrocarbures (Kour *et al.*, 2021).

Le genre *Aspergillus* est l'un des champignons les plus communément exploités pour résoudre les problèmes environnementaux. La polyvalence de ce type de champignon à remédier tout un milieu contaminé par des substances hautement toxiques revient à son habilité de production des enzymes extracellulaires et intracellulaires dans son environnement périphérique (Deshmukh *et al.*, 2016), aussi bien, que sa structure mycélienne qui lui confère un autre avantage pour la bioremédiation, en exploitant le mécanisme de redistribution interne des nutriments et d'énergie issue de la dégradation des polluants par le contrôle du flux de ces derniers dans les réseaux mycéliens (Baranger *et al.*, 2021).

De plus, le genre *Aspergillus* a été largement étudié pour la sorption de métaux lourds grâce à sa paroi qui contient une grande quantité de polysaccharides et de protéines, offrant de nombreux groupes fonctionnelles pour la fixation des ions métalliques (Oyewole *et al.*, 2019).

10. *Aspergillus* source des antioxydants

La littérature scientifique a rapporté que les champignons possèdent de diverses capacités métaboliques, ce qui permet de les rendre très utiles pour remédier aux différents polluants des sols, tel que les métaux lourds, grâce à leur pouvoir antioxydant en réponse à ces éléments toxiques (Bashir *et al.*, 2022).

Le genre *Aspergillus* présente un pouvoir antioxydant similaire à celui des plantes supérieures, ce même auteur a isolé plusieurs souches fongiques endophytes dans le but d'analyser leurs activités antioxydantes, et il a rapporté que l'isolat le plus efficace était le genre *Aspergillus sp.* par rapport à son activité antioxydante (Bashir *et al.*, 2022).

11. Défense antioxydante

Le stress oxydatif est une conséquence naturelle du métabolisme de l'oxygène dans des conditions défavorables, le stress oxydatif est contrôlé par des systèmes de défense antioxydante très efficaces contre la surproduction d'ERO. Le terme antioxydant désigne toute substance capable, à une concentration élevée par rapport à celle du substrat oxydable, de retarder ou empêcher l'oxydation de ce substrat (Yaakoub *et al.*, 2022).

Classiquement, les antioxydants sont classifiés selon leur origine et leur mode d'action, les antioxydants endogènes de type enzymatique sont plutôt impliqués dans la neutralisation des radicaux libres, alors que les antioxydants non enzymatiques et ceux d'origine exogène sont des donneurs de proton ou d'électron (Flieger *et al.*, 2021).

11.1. Défense anti-oxydante enzymatique

Les antioxydants enzymatiques sont considérés comme la première ligne de défense contre les effets délétères des différentes espèces oxydantes, tels que : la catalase (CAT), le superoxyde dismutase (SOD), et la glutathion peroxydase (GPX). Ces enzymes ont une action au niveau de l'anion superoxyde et sur le peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire, donc leur fonction majeure est de réduire la quantité des ERO dans la cellule. Parfois, ces enzymes ont besoin d'oligo-éléments ainsi qu'à d'autres cofacteurs pour exercer leur activité enzymatique (Mironczuk-Chodakowska *et al.*, 2018).

11.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est une métallo-enzyme intracellulaire, présente chez tous les organismes aérobies, cette enzyme catalyse la dismutation de deux anions superoxydes en dioxygène et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est par la suite éliminé par les catalases ou la glutathion peroxydase (GPx). Tandis que cette enzyme, bien qu'ayant une activité antioxydante sur les $O_2^{\bullet -}$ en diminuant leur nocivité, peut être considérée comme source d'espèces oxygénées actives (H_2O_2). Au niveau cellulaire, les SOD se retrouvent à proximité des sites de production d' $O_2^{\bullet -}$ (Ighodaro et Akinloye, 2019 ; Christodoulou *et al.*, 2022).



Les SOD sont représentées en trois classes, en fonction de l'ion métallique qu'ils fixent : SOD de manganèse (Mn-SOD) localisée dans les mitochondries, SOD de fer (Fe-SOD) localisée dans les chloroplastes, et SOD de cuivre-zinc (Cu/Zn-SOD) localisée dans le cytosol, les peroxysomes et les chloroplastes (Ighodaro et Akinloye, 2019 ; Christodoulou *et al.*, 2022).

11.1.2. Catalase (CAT)

Selon Ighodaro et Akinloye (2019), la catalase est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes, composée de quatre sous-unités protéiques, agit en synergie avec la SOD. L'activité de cette enzyme sert principalement à la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire débuté déjà par la SOD, suivant la réaction :



C'est une molécule qui peut convertir environ 6 millions de molécules de H₂O₂ en H₂O et O₂ par minute. Bien que la CAT protège les cellules du peroxyde d'hydrogène et permet l'acquisition de la tolérance du stress oxydatif lors de la réponse cellulaire adaptative (Ighodaro et Akinloye, 2019).

11.1.3. Glutathion peroxydase (GPx)

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme tétramérique à sélénium, constituée de quatre sous unités identiques, chacune contient un seul résidu séléno-cystéine (Se-Cys), ce qui est essentiel pour l'activité enzymatique (Ighodaro et Akinloye, 2019).

Cependant, et à la différence des catalases, les GPx nécessitent la présence d'un substrat particulier pour réaliser leurs activités. Cette enzyme permet la décomposition des peroxydes d'hydrogène lipidiques ROOH et non lipidiques H₂O₂ en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme réducteur, par l'oxydation de ce dernier en glutathion oxydé (GSSG) qui sera réduit ensuite par l'action de la glutathion réductase (Ighodaro et Akinloye, 2019).



Elle est localisée principalement au sein du cytosol et des mitochondries. C'est une autre enzyme de défense pour maintenir l'équilibre cellulaire du statut redox (Ighodaro et Akinloye, 2019).

11.2. Défense antioxydante non-enzymatique

Les antioxydants non enzymatiques sont des substances de faible poids moléculaire, qui possèdent des structures et des propriétés chimiques spécifiques. Leur rôle majeur est de maintenir l'équilibre oxydant/antioxydant en éliminant les radicaux libres, donc protégeant la cellule du stress oxydatif. La glutathion réduit (GSH), la proline, ainsi que la vitamine C et la vitamine E, font partie de cette barrière de défense antioxydante (Zandi et Schnug, 2022).

11.2.1. Glutathion réduit (GSH)

Le glutathion réduit est un composé en thiol soluble dans l'eau, de faible poids moléculaire, sert comme un agent antioxydant très puissant pour l'élimination de toute trace du stress oxydatif en éliminant les espèces réactives de l'oxygène et en protégeant l'organisme des différents dommages oxydatifs (Fouad-Abdulfatah, 2022).

Cette molécule assure de nombreuses fonctions, telles que la régulation enzymatique et la résistance aux agents pathogènes. Le GSH est un tri-peptide (γ -glutamyl-L-cystéinyl-glycine), qui se trouve dans les mitochondries, les vacuoles, les chloroplastes, le cytosol et le réticulum endoplasmique (El-Beltagi *et al.*, 2020 ; Rasheed *et al.*, 2023).

11.2.2. Proline

La proline fait partie des agents de défense antioxydante, elle sert comme piègeur et protecteur non enzymatique contre le stress induit par les espèces réactives de l'oxygène. L'implication de cet acide aminé pour l'élimination des oxydants aura lieu une fois qu'il est synthétisé à partir d'acide glutamique, cette réaction implique un intermédiaire qui est la pyrroline-5-carboxylate synthase (P5C-S) (Zandi et Schnug, 2022 ; Rasheed *et al.*, 2023).

La proline est un acide aminé, qui représente une partie importante des protéines structurales, le dosage de cet acide aminé est considéré comme critère de sélection pour la tolérance au stress. Elle agit comme chélateur des métaux lourds, aussi comme un régulateur de potentiel redox cellulaire en empêchant la mort cellulaire (Zandi et Schnug, 2022 ; Rasheed *et al.*, 2023).

11.2.3. Vitamine E et vitamine C

La vitamine E est un groupe de liposolubles, donc sa structure naturelle possède quatre tocophérols et quatre tocotriénols, avec une activité antioxydante différente. La vitamine E (α -tocophérol) est considérée comme l'un des principaux composants pour la protection contre la peroxydation lipidique et les ERO (Pincemail et Meziane, 2022).

La vitamine C ou acide ascorbique est un piègeur des ERO à spectre large, considérée comme un antioxydant efficace dans les cellules pour lutter contre le stress oxydatif. C'est un cofacteur essentiel de nombreuses réactions enzymatiques, un antioxydant hydrosoluble, 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 des oxydants et la réduction de radicale α -tocophérol pour obtenir une très bonne efficacité de la vitamine E (Zandi et Schnug, 2022 ; Rasheed *et al.*, 2023).

Discussion des résultats

La pollution métallique des sols est devenue de nos jours une préoccupation majeure en raison de ses effets néfastes sur l'écosystème en générale et sur la santé humaine en particulier. En Algérie, la pollution des sols par les métaux lourds et les métalloïdes potentiellement toxiques est principalement issue des mines abandonnées, présentes dans de nombreuses régions ayant un historique d'exploitation minière (Meghnous *et al.*, 2019).

La présente étude entre dans le cadre d'une continuité de travail réalisé sur une zone minière de la région de Djebel Hamimat (Nord-Est de l'Algérie), où Rached-Mosbah *et al.* (1997) et Bentellis *et al.* (2014) ont mis en évidence la présence de divers métaux toxiques principalement l'antimoine 2600 mg/kg, soit 21.4 mM, l'arsenic 450 mg/kg, soit 6 mM, le plomb 145 mg/kg, soit 0.7 mM, le cuivre 42 mg/kg, soit 0.7 mM et le zinc 324 mg/kg, soit 5 mM, ces mêmes auteurs ont rapporté que plusieurs espèces végétales dont principalement *Hedysarum pallidum* Desf. et *Lygeum spartum* L. parviennent à se développer sur de tels substrats toxiques.

Selon Meghnous *et al.* (2019), cette zone est semi-aride située à Oum el Bouaghi, caractérisée par une végétation steppique à vocation pastorale, il existe donc une possibilité réelle d'une contamination de toutes ces plantes par les métaux lourds et d'un transfert et d'une concentration de ces derniers dans tous les maillons de la chaîne trophique.

Pour répondre à cette problématique des hypothèses ont été émises par Meghnous *et al.* (2019) et Kassa-Laouar *et al.* (2020) que l'adaptation d'*Hedysarum pallidum* Desf. et *Lygeum spartum* L à la toxicité de ces sols pourrait être liée à la présence d'une flore microbienne racinaire résistante qui a acquis la capacité de piéger et neutraliser les ERO générées par la toxicité des éléments métalliques afin de protéger les plantes hôtes contre le stress oxydatif.

Dans les travaux de Meghnous (2020), une souche fongique endophyte a été isolée à partir des racines de la plante *Hedysarum pallidum* Desf. appartenant au genre *Aspergillus* a montré une tolérance et /ou résistance à des doses élevées en Pb (PbNO_2) atteignant une CMI de 2 mM. Les méthodes d'isolement, de sélection et des dosages des biomarqueurs antioxydants sont décrits par Meghnous *et al.* (2019) (**Annexe 1**).

L'objectif du présent travail est d'étudier les mécanismes de tolérance antioxydants d'*Aspergillus* à des concentrations croissantes de plomb (0.25 mM, 0.5 mM, 0.75 mM et 1 mM), ceci afin d'évaluer la capacité de ce champignon endophyte à dépolluer les sols contaminés par le Pb.

Cette étude porte sur l'évaluation de l'impact du plomb sur la croissance de l'endophyte fongique, la mesure des biomarqueurs du stress oxydatifs (H_2O_2) et la teneur intracellulaire en proline) et la mesure des activités des enzymes antioxydantes à savoir la SOD et la CAT.

1. Analyse et discussion des résultats

1.1. Impact du plomb sur la croissance de l'endophyte fongique *Aspergillus sp.*

La figure 14, montre l'effet de la toxicité du Pb dans le milieu de culture sur la biomasse d'*Aspergillus sp.* représentée par son poids sec. Cette figure permet de constater que cet endophyte fongique a subi une diminution significative de sa croissance mycélienne due aux doses croissantes du Pb dans le milieu de culture.

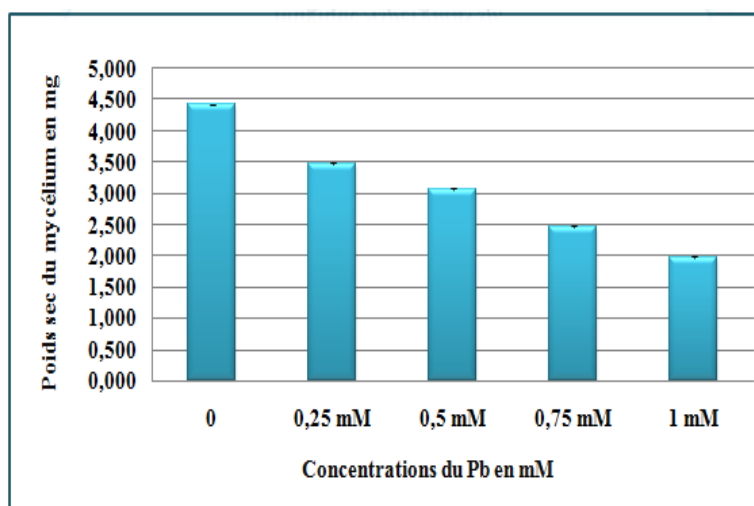


Figure 14 : Variation du poids sec du mycélium d'*Aspergillus sp.* en fonction des différentes concentrations du Pb

La souche *Aspergillus sp.* marque une croissance maximale en absence totale du Pb (0 mM), alors qu'à partir de 0.25 mM Pb une diminution significative et progressive de la biomasse fongique a été constatée. A 1 mM Pb, *Aspergillus sp.* a gardé 44 % de sa biomasse par rapport au témoin, malgré la toxicité du milieu.

Ce test de toxicité *in vitro* montre qu'*Aspergillus sp.* présente une tolérance à des concentrations du plomb allant jusqu'à 1 mM ce qui correspond au niveau maximal du Pb (0.7 mM) déterminé dans la zone minière étudiée par Bentellis *et al.* (2014). Ce résultat montre qu'*Aspergillus sp.* est 7 fois plus résistant par rapport aux teneurs retrouvées dans cette zone minière.

D'après les résultats obtenus par Meghnous (2020), la diminution progressive de la croissance d'*Aspergillus sp.* peut-être causée par l'effet inhibiteur et toxique du Pb sur le développement de cette souche, ce résultat est similaire à la réponse d'*Aspergillus tamaritii* en présence des doses croissantes des métaux suivants : Cd, Co, Ni et Pb rapportée par Abd El-Ghany et Abd El-Mongy, (2009), ainsi que les travaux de Karlinski *et al.* (2009), qui ont montré que la présence des métaux lourds dans un milieu de culture affecte la disponibilité des nutriments ce qui va influencer négativement la croissance fongique par sa réduction. Nos résultats concordent plusieurs travaux en l'occurrence les travaux de Chakraborty *et al.*, 2012 sur *Aspergillus foetidus* tolérant au Pb, ainsi que les travaux de Meghnous *et al.*, 2019 sur *Aspergillus tubingensis* tolérant à Sb.

D'après Chakraborty *et al.* (2014) les métaux lourds affectent la morphologie des cellules fongiques, provoquant une perturbation dans la perméabilité membranaire causant par la suite une perte importante de nutriments essentiels à la croissance fongique. De plus, ils affectent la structure génétique des espèces fongiques, induisant une réduction de la biosynthèse des acides nucléiques et des protéines.

Le plomb devient toxique pour les souches fongiques lorsqu'il dépasse un certain seuil en inhibant leur croissance en provoquant une oxydation de l'ADN et une peroxydation lipidique et protéique, sachant que ces souches peuvent garder une quantité de leur biomasse même en présence de la toxicité. La présente analyse montre une similarité avec les travaux de Chakraborty *et al.* (2014) sur le cadmium.

1.2. Impact du plomb sur la teneur intracellulaire en H₂O₂

Selon Jamdade et Bodare, (2023) la toxicité du plomb dans le milieu de culture provoque la formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) tel que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier est moins toxique par rapport aux autres ERO, vu qu'il ne possède pas des électrons non appariés, mais malgré ça il est capable de provoquer différents dommages oxydatifs (Bienert *et al.*, 2007). Tandis que ce dernier peut être produit dans des conditions

normales chez tous les organismes vivants aérobies pour la production de l'énergie (Meghnous, 2020).

La figure 15, montre la teneur en H_2O_2 intracellulaire d'*Aspergillus sp.* en fonction des concentrations du plomb. Cette figure permet de constater que la teneur en H_2O_2 augmente significativement avec l'accroissement des doses du Pb dans le milieu de culture.

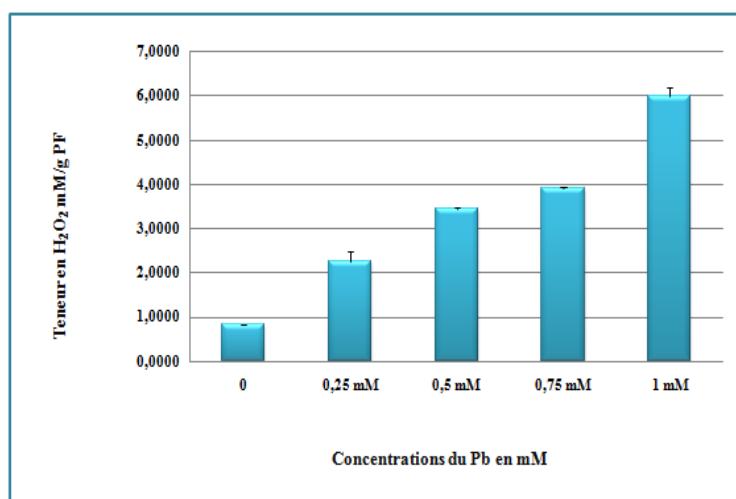


Figure 15 : Teneur en H_2O_2 chez *Aspergillus sp.* en fonction des concentrations du Pb

D'après cette figure, qui permet de remarquer que même en absence du Pb le peroxyde d'hydrogène est généré dans les cellules d'*Aspergillus sp.* avec une concentration de 0.8 mM/g, tandis qu'avec l'accroissement des concentrations du Pb la quantité de cet oxydant augmente atteignant les 6 mM/g à 1 mM Pb.

Ce résultat peut s'expliquer comme suit le peroxyde d'hydrogène est généré le plus normalement possible chez tous les organismes vivants aérobies dans des conditions normales, alors que dans des conditions de stress telle la présence du Pb, la teneur d' H_2O_2 chez ce mycoendophyte est élevée, vu que cet oxydant fait partie des espèces réactives de l'oxygène produites sous l'effet du stress oxydatif. Ce qui est similaire aux travaux de Chakraborty *et al.* (2012, 2014) pour *Aspergillus foetidus* en présence du Pb et Cd, aussi aux travaux de Meghnous *et al.* (2019) pour *Aspergillus tubingensis* en présence de Sb.

1.3. Impact du plomb sur la teneur intracellulaire en proline

La proline est un acide aminé qui sert à réduire les effets néfastes induits par les espèces réactives de l'oxygène sous un stress oxydatif généré par les métaux lourds, en inhibant les dommages cellulaires comme la peroxydation lipidique. La production de cet acide aminé est indiquée comme exemple lorsque la souche résiste aux concentrations croissantes du Pb, donc sa capacité à tolérer ce métal (Zandi et Schnug, 2022).

La figure 16, montre la teneur intracellulaire en proline d'*Aspergillus sp.* générée en présence des doses croissantes du Pb. La teneur de cet acide aminé augmente significativement avec l'accroissement des doses du Pb dans le milieu de culture.

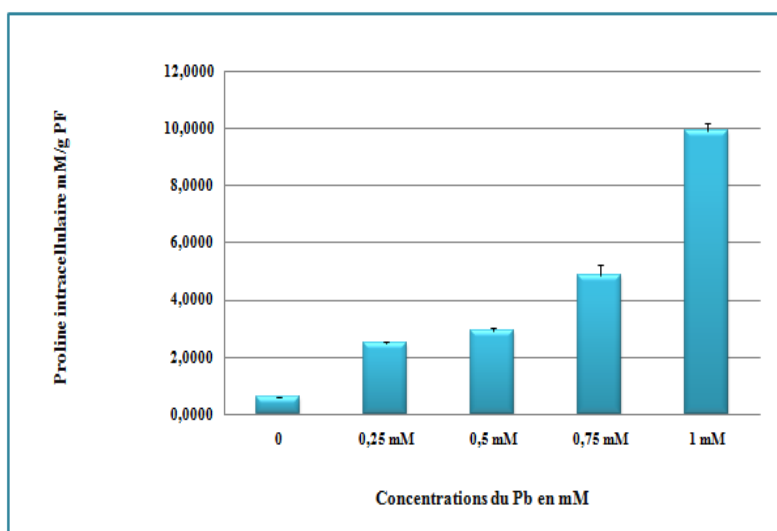


Figure 16 : Teneur intracellulaire en proline chez *Aspergillus sp.* en fonction des concentrations du Pb

La figure 16 montre une augmentation progressive des teneurs intracellulaires en proline allant du témoin jusqu'à 1 mM Pb où cet acide aminé est libéré par une grande quantité notons presque 10 (mM/g PF).

L'augmentation des teneurs intracellulaires en proline chez *Aspergillus sp.* peut s'expliquer par la génération des espèces réactives de l'oxygène en présence des doses croissantes du Pb, ceci fait référence aux capacités antioxydantes de cette souche pour tolérer et résister à la pollution métallique. Ce résultat est similaire à celui de Chakraborty *et al.* (2014) qui met en évidence l'accroissement de la teneur en proline intracellulaire d'*Aspergillus foetidus* en fonction des doses croissantes du Cd.

En effet, selon Raj et Mohan (2016) et Meghnous (2020), les doses élevées de la proline intracellulaire sont des caractéristiques spécifiques des populations hypertolérantes aux métaux lourds, suggérant que la proline intracellulaire joue un rôle fonctionnel dans la résistance élevée aux métaux.

1.4. Impact du plomb sur l'activité de la SOD

Le superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme qui constitue la première barrière de défense antioxydante, protégeant la cellule contre le stress oxydatif généré par la présence des métaux comme le Pb (Ighodaro et Akinloye, 2019).

La représentation graphique 17, illustre la mesure de la SOD d'*Aspergillus sp.* en présence des concentrations croissantes du Pb, cette enzyme augmente d'une façon non constante avec l'accroissement des doses du Pb dans le milieu de culture.

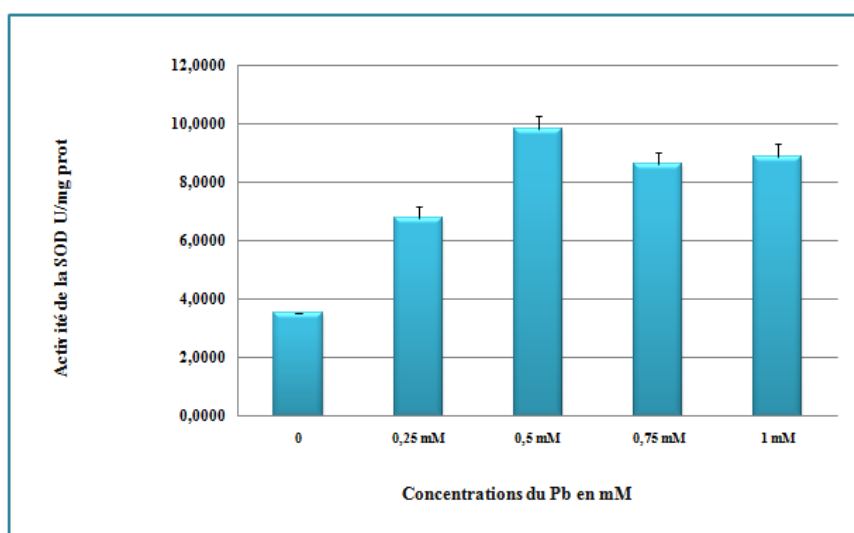


Figure 17 : Activité de la SOD d'*Aspergillus sp.* en fonction des concentrations du Pb

D'après la représentation graphique, qui permet de constater que les activités de la SOD chez *Aspergillus sp.* augmente d'une manière non constante. Dans les conditions normales (témoin) l'activité de la SOD est inférieure à 4 (U/mg de prot), alors qu'avec l'augmentation des doses du Pb allant jusqu'à 0.5 mM Pb, l'activité de la SOD augmente arrivant à son maximum, notons presque (10 U/mg de prot). Au-delà de 0.5 mM Pb l'activité de cette enzyme marque une certaine réduction.

L'accroissement des concentrations du Pb dans le milieu de culture, induit la synthèse de la SOD, cet accroissement d'activité de la SOD s'explique par l'augmentation de la concentration de son substrat, le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Car cette enzyme catalyse la dismutation de deux molécules de ce radical en oxygène (O_2) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

L'ajout des doses élevées en Pb dans le milieu de culture a provoqué une réduction de la SOD, ceci peut être justifié par la sensibilité de cette enzyme à la surproduction des espèces réactives de l'oxygène notamment le H_2O_2 .

L'induction de la SOD lors d'un stress métallique a été rapportée par Mukherjee *et al.* (2010), Chakraborty *et al.* (2012, 2014) et Meghnous *et al.* (2019).

1.5. Impact du plomb sur l'activité de la CAT

Un organisme vivant en aérobie est protégé de l'effet oxydant délétère du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) grâce à l'activité de la catalase (CAT), cette dernière fait partie du système enzymatique antioxydant (Ighodaro et Akinloye, 2019).

La figure 18, montre l'effet des concentrations croissantes du Pb sur l'activité de la catalase chez *Aspergillus sp.*, où cette activité augmente significativement et progressivement avec l'augmentation des doses du Pb dans le milieu de culture.

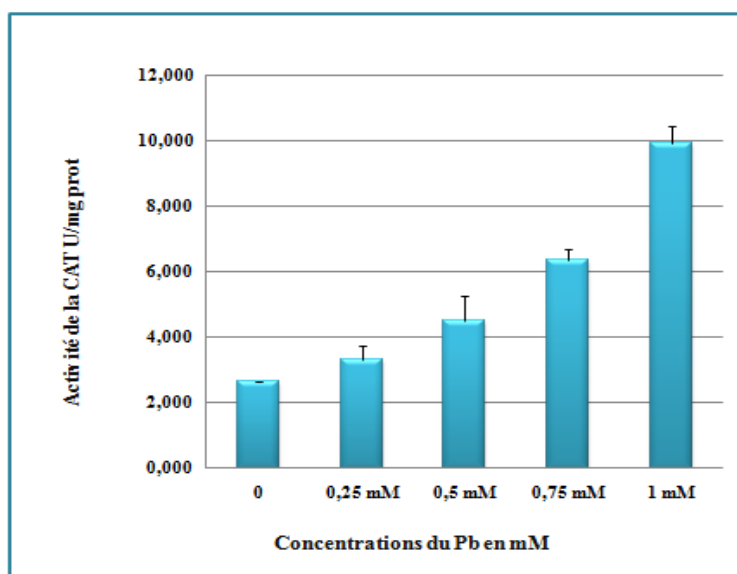


Figure 18 : Activité de la CAT d'*Aspergillus sp.* en fonction des concentrations du Pb

D'après cette figure, l'activité de la catalase augmente graduellement en fonction des concentrations croissantes du Pb, allant de 2.6 U/mg de prot en absence totale du Pb jusqu'à son maximum arrivant à presque 10 U/mg de prot à 1 mM Pb.

La catalase joue un rôle important dans la détoxification du H₂O₂ pendant un stress oxydatif puisqu'elle l'élimine par sa conversion en H₂O. La stimulation de la synthèse de la CAT d'*Aspergillus sp.* est constatée suite à l'addition de doses graduelles en Pb.

Cette dernière peut être expliquée par l'augmentation de la concentration de son substrat H₂O₂, suite à l'augmentation de la concentration des ions Pb dans le milieu de culture de l'endophyte fongique. Cela met en évidence l'implication de cette enzyme dans la catalyse du H₂O₂ intracellulaire formé en présence du plomb.

Cette souche endophyte a montré une résistance aux concentrations élevées d'H₂O₂ par l'accumulation de ce dernier dans son milieu intracellulaire, en permettant sa dismutation en O₂ et H₂O, ceci va déclencher la réponse antioxydante pour lutter contre le stress induit par ce métal. Cette souche est capable donc de survivre dans des milieux fortement contaminés, en tolérants les fortes doses en métaux lourds.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Cavalcanti-Luna *et al.* (2015), pour *Aspergillus niger* en présence de Cu, ainsi que Meghnous, (2020), dans ces travaux pour l'activité de la CAT de *Fusarium oxysporum* en présence du Sb.

Conclusion et perspectives

La contamination de la zone minière de Djebel Hamimat (Nord-Est de l'Algérie) par le plomb présente un risque majeur pour tous les organismes vivants cohabitant dans cette zone, où seulement les organismes tolérants aux métaux lourds peuvent survivre dans un site pollué comme celui-ci.

L'analyse réalisée au cours de cette étude porte sur l'impact des différentes concentrations du plomb sur la réponse antioxydante de la souche endophyte *Aspergillus sp.* et d'après les résultats obtenus nous concluons que :

- Les teneurs élevées du Pb dans le milieu de culture d'*Aspergillus sp.* ont entraîné une diminution progressive de la croissance fongique, cette souche endophyte s'est avérée tolérante car 1 mM Pb, elle a gardé 44% de sa biomasse par référence au témoin.
- La présence des doses importantes du Pb dans le milieu de culture, a provoqué une forte accumulation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dans son milieu intracellulaire, ceci s'est traduit par la diminution de la croissance fongique.
- A l'origine de la tolérance à des doses élevées en Pb et la génération des ERO, la synthèse de la proline a été induite chez *Aspergillus sp.* et par conséquent la production des enzymes antioxydantes à savoir la SOD et la CAT, illustrant la capacité de cet endophyte à s'adapter aux stress métalliques.

Un tel travail permet d'ouvrir de multiples voies futures de recherche, où il est intéressant de :

- Étudier la réponse antioxydante de la souche endophyte *Aspergillus sp.* par la mesure d'autres oxydants, notamment l'anion superoxyde et le radical hydroxyle.
- Compléter ce travail par l'étude moléculaire des gènes responsables impliqués dans la tolérance et la résistance aux métaux lourds.
- Utiliser les endophytes fongiques tolérantes au stress oxydatif pour produire des molécules bioactives (les antioxydants), dans le but de remédier les sols pollués métalliquement.

Références bibliographiques

A

- **Abd El-Ghany, T. M., Abd El-Mongy, M. (2009).** Bioremoval of heavy metals in presence of oxalic and citric acid using *Aspergillus tamari*. The Egyptian society of experimental biology, vol (5), 53-58.
- **Aboubakar, A., El Hajjaji, S., Douaik, A., Mewouo, Y. C. M., Birang a Madong, R. C., Dahchour, A., Mabrouki, J., Labjar, N. (2021).** Heavy metal concentrations in soils and two vegetable crops (*Corchorus olitorius* and *Solanum nigrum L.*), their transfer from soil to vegetables and potential human health risks assessment at selected urban market gardens of Yaoundé, Cameroon. International journal of environmental analytical chemistry.
- **Adeleke, B. S., Ayilara, M. S., Akinola, S. A., Babalola, O. O. (2022).** Biocontrol mechanisms of endophytic fungi. Egyptian journal of biological pest control, 32(46).
- **Akhtar, N., Mannan, M. A. (2020).** New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering : mycoremediation : an unexplored gold mine. India. 11-24.
- **Ali, H., Khan, E. (2018).** Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs—Concepts and implications for wildlife and human health. Human and ecological risk assessment:an international journal, 25(6), 1335-1376.
- **Ali, H., Khan, E. (2018).** What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term ‘heavy metals’__proposal of a comprehensive definition. Toxicological & environmental chemistry, 100(1), 6-19.
- **Alik, O., Oudainia, S., Bouchebbah, S., Dehbi-zebboudj, A., Zerouali-khodja, F. (2021).** Heavy metal and trace element bioaccumulation in muscle and liver of the merlu (*Merluccius merluccius Linneaus, 1758*) from the gulf of Bejaia in Algeria. Ekológia (Bratislava) - journal of the institute of landscape ecology, slovak academy of sciences, 40(1), 91-100.
- **Alkorta, I., Hernandez-Allica, J., Becerril, J. M., Amezaga, I., Albizu, I., Garbisu, C. (2004).** Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. Reviews in environmental science and biotechnology, vol (3), 71-90.
- **Alzahrani, H. R., Kumakli, H., Ampiah, E., Mehari, T., Thornton, A. J., Babyak, C. M., Fakayode, S. O. (2016).** Determination of macro, essential trace elements, toxic heavy metal concentrations, crude oil extracts and ash composition from Saudi Arabian fruits and vegetables having medicinal values. Arabian journal of chemistry, 10(7), 906-913.
- **Amara, A. A., Abd El-Baky, N. (2023).** Fungi as a source of edible proteins and animal feed. Journal of fungi, 9(1), 73.

- **Antibachi, D., Kelepertzis, E., Kelepertsis, A. (2012).** Heavy metals in agricultural soils of the mouriki-thivaarea (central greece) and environmental impact implications. Soil and sediment contamination, 21(4), 434-450.
- **Antoniadis, V., Robinson, J. S., Alloway, B. J. (2008).** Effects of short-term pH fluctuations on cadmium, nickel, lead, and zinc availability to ryegrass in a sewage sludge-amended field. Chemosphere, 71(4), 759-764.
- **Asrari, E. (2014).** Heavy metal contamination of water and soil : analysis, assessment, and remediation strategies. Canada : apple academic press. 382 p.
- **Assi, M. A., Hezme, M. N. M., Haron, A., Sabri, M. Y. M., Rajion, M. A. (2016).** The detrimental effects of lead on human and animal health. Veterinary world, 9(6), 660-671.
- **Azimi, A., Azari, A., Rezakazemi, M., Ansarpour, M. (2017).** Removal of heavy metals from industrial waste waters : a review. Chemical and biochemical engineering reviews, 4(1), 37-59.

B

- **Baranger, C., Pezron, I., Lins, L., Deleu, M., Le Goff, A., Fayeulle, A. (2021).** A compartmentalized microsystem helps understanding the uptake of benzo[a]pyrene by fungi during soil bioremediation processes. Science of the total environment, vol (784), 147-151.
- **Barh, A., Kumari, B., Sharma, S., Kumar Annepu, S., Kumar, A., Kamal, S., Sharma, V. P. (2019).** Smart bioremediation technologies : mushroom mycoremediation: kinetics and mechanism. India. 1-22.
- **Baron, N. C., Rigobelo, E. C. (2022).** Endophytic fungi : a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. An international journal on fungal biology, 13(1), 39-55.
- **Bashir, S., Javed, S., Al-anazi, KH. M., Abul-farah, M., Ali, S. (2022).** Bioremediation of cadmium toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.) plants primed with l-proline, *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger*. International journal of environmental research and public health, 19(19), 12683.
- **Belazouz, L. (2020).** Synthèse bibliographique des travaux sur les mycoendophytes des racines, feuilles et fruits du pistachier de l'atlas en Algérie. Mémoire de master : biodiversité et écologie végétale. Tizi-ouzou : université de Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou, 65p.
- **Bentellis, A., Azzoug, R., El-okki, M. H., Rached, O. (2014).** Trace elements pollution from an abandoned mine and factors affecting antimony concentrations in the dahimine wadi bank soils (northeast Algeria). Carpathian journal of earth and environmental sciences, 9(1), 95-106.
- **Bertrand, P. (2008).** Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. Thèse de doctorat : Ecotoxicologie. Toulouse : Université de Toulouse, 289p.

- **Bhat, S. A., Tahseen, H., Sabhiya, M. (2019).** Heavy metal toxicity and their harmful effects on living organisms - a review. *International journal of medical science and diagnosis research*, 3(1), 106-122.
- **Bienert, G. P., Moller, A. L. B., Kristiansen, K. A., Schulz, A., Moller, I. M., Schjoerring, J. K., Jahn, T. P. (2007).** Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *The journal of biological chemistry*, 282(2), 1183-1192.
- **Blaszczyk, L., Salamon, S., Mikolajczak, K. (2021).** Fungi inhabiting the wheat endosphere. *Pathogens*, 10(10), 1288.

C

- **Cachada, A., Rocha-Santos, T., Duarte, A. C. (2018).** Soil pollution : soil and pollution : an introduction to the main issues. Portugal : academic press. 1-28.
- **Caporale, A. G., Violante, A. (2015).** Chemical processes affecting the mobility of heavy metals and metalloids in soil environments. *Current pollution reports*, vol (2), 15-27.
- **Cavalcanti Luna, M. A., Vieira, E. R., Okada, K., Campos-Takaki, G. M., DO Nascimento, A. E. (2015).** Copper-induced adaptation, oxidative stress and its tolerance in *Aspergillus niger* UCP1261. *Electronic journal of biotechnology*, 18(6), 418-427.
- **Chakraborty, S., Mukherjee, A., Das, T. K. (2012).** Biochemical characterization of a lead-tolerant strain of *Aspergillus foetidus*: an implication of bioremediation of lead from liquid media. *International biodeterioration and biodegradation*, vol (84), 134–142.
- **Chakraborty, S., Mukherjee, A., Khuda-Bukhsh, A. R., Das, T. K. (2014).** Cadmium-induced oxidative stress tolerance in cadmium resistant *Aspergillus foetidus* : its possible role in cadmium bioremediation. *Ecotoxicology and environmental safety*, vol (106), 46-53.
- **Cho, H. J., Son, S. H., Chen, W., Son, Y. E., Lee, I., Yu, J. H., Park, H. S. (2022).** Regulation of conidiogenesis in *Aspergillus flavus*. *Cells*, 11(18), 2796.
- **Christodoulou, M. C., Palacios, J. C. O., Hesami, G., Jafarzadeh, S., Lorenzo, J. M., Dominguez, R., Moreno, A., Hadid, M. (2022).** Spectrophotometric methods for measurement of antioxidant activity in food and pharmaceuticals. *Antioxidants*, 11(11), 2213.
- **Chu, Z., Lin, C., Yang, K., Cheng, H., Gu, X., Wang, B., Wu, L., Ma, J. (2022).** Lability, bioaccessibility, and ecological and health risks of anthropogenic toxic heavy metals in the arid calcareous soil around a nonferrous metal smelting area. *Chemosphere*, 307(4).
- **Cobbina, S. J., Chen, Y., Zhou, Z., Wu, X., Feng, W., Wang, W., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., Wu, X., Yang, L. (2015).** Low concentration toxic metal mixture interactions: Effects on essential and non-essential metals in brain, liver, and kidneys of mice on sub-chronic exposure. *Chemosphere*, vol (132), 79-86.

D

- **Danial, E. N., Majrashi, W. A., Bin Afif, A. O., Alamri, E. S., Alhatimi, E. M., Alghamdi, N. J. (2021).** Cytotoxicity and bioremediation of heavy metals by highly resistant marine bacteria. *Journal of advances in biology and biotechnology*, 24(4), 48-72.
- **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, S., Raj, R., Mangwani, N., Dash, H. R., Chakraborty, J. (2014).** Microbial biodegradation and bioremediation : heavy metals and hydrocarbons : Adverse Effects and Mechanism of Toxicity. India.23-54.
- **Daulagala, P. W. H. K. P. (2021).** Chitinolytic endophytic bacteria as bio-control agents for phytopathogenic fungi and nematode pests : a review. *Asian journal of research in botany*, 5(3), 14-24.
- **De Carvalho, J. O., Broll, V., Martinelli, A. H. S., Lopes, F. C. (2020).** Molecular aspects of plant beneficial microbes in agriculture : endophytic fungi : positive association with plants. Brazil. 315-337.
- **De Francisco, N., Ruiz Troya, J. D., Aguera, E. I. (2003).** Lead and lead toxicity in domestic and free living birds. *Avian pathologie*, 32(1), 3-13.
- **Deng, Z., Cao, L. (2017).** Fungal endophyte and their interactions with plants in phytoremediation : a review. *Chemosphere*, vol (168), 1100-1106.
- **Deshmukh, R., Khardenavis, A. A., Purohit, H. J. (2016).** Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. *Indian journal of microbiology*, vol (56), 247-264.
- **Deshommes, E., Andrews, R. C., Gagnon, G., Tim, M., Brad, M., Evelyne, D., Shokoufeh, N., Prévost, M. (2016).** Evaluation of exposure to lead from drinking water in large buildings. *Water research*, vol (99), 46-55.
- **Dhiman, V. K., Singh, D., Pandey, H., Chauhan, D., Dhiman, V. K., Pandey, D. (2022).** Sustainable management of environmental contaminants : Mycoremediation of agricultural waste for the cultivation of edible mushroom. India : springer. 741-782.
- **Djebrouni, Ch., Bouafia, W. (2020).** La phytoremédiation des eaux de surface par les macrophytes aquatiques : cas des métaux lourds. Mémoire de master : Hydrobiologie marine et continentale. Jijel : Université Mohammed Seddik Benyahia- Jijel, 65p.

E

- **El Hachimi, M. L., Fekhaoui, M., El Abidi, A., Rhoujatti, A. (2014).** Contamination des sols par les métaux lourds à partir de mines abandonnées : le cas des mines Aouili-Mibladen-Zeida au Maroc. Cahiers agricultures, 23(3).
- **El-baltagi, H. S., Mohamed, H. I., Sofy, M. R. (2020).** Role of ascorbic acid, glutathione and proline applied as singly or in sequence combination in improving chickpea plant through physiological change and antioxidant defense under different levels of irrigation intervals. Molecules, 25(7), 1702.
- **Elhamalawy, O. H. (2018).** Protective effect of pumpkin seed oil against lead acetate toxicity in male mice. Al-Azhar journal of pharmaceutical sciences, 58(2), 115-129.
- **El-hawary, S. S., Moawad, A. S., Bahr, H. S., Abdelmohsen, U. R., Mohammed, R. (2020).** Natural product diversity from the endophytic fungi of the genus *Aspergillus*. Royal society of chemistry advances, vol (10), 22058-22079.
- **Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., Xie, Y. (2015).** Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. The scientific world journal, 2015(756120), 18.
- **Emmanuel, A. J., Igoche, O. P. (2022).** Isolation and characterization of antibiotic producing fungi from soil. Microbiology research journal international, 32(9), 28-40.

F

- **Flieger, J., Flieger, W., Baj, J., Maciejewski, R. (2021).** Antioxidants : classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. Materials, 14(15), 4135.
- **Fouad-Abdulfatah, H. (2022).** Non-enzymatic antioxidants in stressed plants : a review. Journal of university of anbar for pure science, 16(2), 25-37.

G

- **Grabka, R., D'Entremont, T. W., Adams, S. J., Walker, A. K., Tanney, J. B., Abbasi, P. A., Ali, S. (2022).** Fungal endophytes and their role in agricultural plant protection against pests and pathogens. Plants, 11(3), 384.

H

- **Hagag, A., Abdelwahab, M. F., Abd el-kader, A. M., Fouad, M. (2022).** The endophytic *Aspergillus* strains : a bountiful source of natural products. Journal of applied microbiology, vol (132), 4150-4169.

- **Hamba, Y., Tamiru, M. (2016).** Mycoremediation of heavy metals and hydrocarbons contaminated environment. *Asian journal of natural and applied sciences*, 5(2), 48-58.
- **Hansda, A., Kumar, V., Anshumali. (2016).** A comparative review towards potential of microbial cells for heavy metal removal with emphasis on biosorption and bioaccumulation. *World journal of microbiology and biotechnology*, 32(170).
- **Hernandez, E., Obrist-Farner, J., Brenner, M., Kenney, W. F., Curtis, J. H., Duarte, E. (2020).** Natural and anthropogenic sources of lead, zinc, and nickel in sediments of Lake Izabal, Guatemala. *Journal of environmental sciences*, vol (96), 117-126.
- **Hodkinson, T. R., Doohan, F. M., Saunders, M. J., Murphy, B. R. (2019).** Endophytes for a growing world. United Kingdom : Cambridge university press.

I

- **Ighodaro, O. M., Akinloye, O. A. (2019).** First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX) : their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287-293.
- **Igiri, B. E., Okoduwa, S. I. R., Idoko, G. O., Akabuogu, E. P., Adeyi, A. O., Ejiogu, I. K. (2018).** Toxicity and bioremediation of heavy metals contaminated ecosystem from tannery wastewater:areview. *Journal of toxicology*, 2018 (2568038), 16.
- **Ingrid, I. N. (2021).** Pollution and Law. *Technium social sciences journal*, vol (25), 161-166.

J

- **Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagab, N., Mathew, B. B., Beeregowda, K. N. (2014).** Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Inter disciplinary toxicology*, 7(2), 60-72.
- **Jamdade, C. B., Bodare, R. D. (2023).** A mini review on free radicals-generated in biological system. *World journal of pharmaceutical research*, 12(3), 661-668.
- **Janssen, J., Weyens, N., Croes, S., Beckers, B., Meiresonne, L., Van Peteghem, P., Carleer, R., Vangronsveld, J. (2015).** Phytoremediation of metal contaminated soil using willow : exploiting plant-associated bacteria to improve biomass production and metal uptake. *International journal of phytoremediation*, 17(11), 1123-1136.
- **Jariyal, M., Yadav, M., Singh, N. M., Yadav, S., Sharma, I., Dahiya, S., Thanki, A. (2020).** Bioremediation of pollutants : microbial remediation progress and future prospects. *India*. 187-214.
- **Jia, Y., Rui, Y. (2021).** Study on the predictive algorithm of plant restoration under heavy metals. *Scientific programming*, 2021(6193182), 10.

- **Jiang, H. H., Cai, L. M., Wen, H. H., Hu, G. C., Chen, L. G., Luo, J. (2019).** An integrated approach to quantifying ecological and human health risks from different sources of soil heavy metals. *Science of the total environment*, vol (701), 134466.
- **Juan, C. A., Pérez de la Lstra, J. M., Plou, F. J., Pérez-Lebena, E. (2021).** The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited : outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipides and priteins) and inducted pathologies. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4642.

K

- **Karimi, H., Mahdavi, S., Lajayer, B. A., Moghiseh, E., Rajput, V. D., Minkina, T., Astatkie, T. (2021).** Insights on the bioremediation technologies for pesticide-contaminated soils. *Environmental geochemistry and health*, vol (44), 1329–1354.
- **Karlinski, L., Rudawska, M., Kieliszewska-Rokicka, B., Tomasz, L. (2009).** Relationship between genotype and soil environment during colonization of poplar roots by mycorrhizal and endophytic fungi. *Mycorrhiza*, 20(5), 315-324.
- **Kassa-Laouar, M., Mechakra, A., Rodrigue, A., Meghnous, O., Bentellis, A., Rached, O. (2020).** 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.
- **Kour, D., Kaur, T., Devi, R., Yadav, A., Singh, M., Joshi, D., Singh, J. ... (2021).** Beneficial microbiomes for bioremediation of diverse contaminated environments for environmental sustainability : present status and future challenges. *Environmental science and pollution research*, vol (28), 24917-24939.
- **Krzywy, I., Krzywy, E., Pastuszek-gabinowska, M., Brodkiewicz, A. (2010).** Lead—is there something to be afraid of. *Annales academia medica estetinensis*, 56(2), 118-128.
- **Kulshreshtha, S., Mathur, N., Bhatnagar, P. (2014).** Mushroom as a product and their role in mycoremediation. *Amb express*, 4 (29).
- **Kumar, A., Parasad, M. N. V. (2018).** Plant-lead interactions: transport, toxicity, tolerance, and detoxification mechanisms. *Ecotoxicology and environmental safety*, vol (166), 401-418.
- **Kumar, V., Dwivedi, S.K. (2021).** Mycoremediation of heavy metals : processes, mechanisms, and affecting factors. *Environmental science and pollution research*, vol (28), 10375-10412.
- **Kumar, V., Jain, L., Kaushal, P., Soni, R. (2021).** Fungi bio-prospects in sustainable agriculture, environment and nanotechnology : Fungal endophytes and their applications as growth promoters and biological control agents. *India*. 315-337.

L

- **Li, C., Zhou, K., Qin, W., Tian, C., Qi, M., Yan, X., Han, W. (2019).** A review on heavy metals contamination in soil : effects, sources, and remediation techniques. *Soil and sediment contamination : an international journal*, 28(4), 380-394.
- **Lopareva-pohu, A. (2011).** Intérêt de la phytostabilisation aidée pour la gestion des sols pollués par des éléments traces métalliques (Cd, Pb, Zn). Thèse de doctorat : Remédiation des sols. Côte d'Opale : Université du littoral côte d'Opale, 288 p.

M

- **Makhlouf, J. (2019).** Caractérisation de la biodiversité des souches d'*Aspergillus* de la section flavi isolées d'aliments commercialisés au Liban : approche moléculaire, métabolique et morphologique. Thèse de doctorat : pathologie, toxicologie, génétique et nutrition. Toulouse : université de Toulouse, 142p.
- **Mani, D., Kumar, C. (2013).** Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems : an overview with special reference to phytoremediation. *International journal of environmental science and technology*, 11(3), 843-872.
- **Meer, B. B., Dishan, E. E., Ikima, D., Ateh, G. O. (2020).** Ecological implications of environmental contaminants on biodiversity and ecosystem services : the Nigerian experience. *Basic research journal of soil and environmental science*, 2(1), 001-009.
- **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 Constatine 1, 192 p.
- **Meghnous, O., Dehimat, L., Doumas, P., Kassa-Laouar, M., Mosbah, F., Rached, O. (2019).** Oxidative and antioxidative responses to antimony stress by endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* isolated from antimony accumulator *Hedysarum pallidum* Desf. *Biologia*, vol(74), 1711-1720.
- **Midhat, L., Mandi, L., Ouazzani, N., Tounsi, A., Zine, H., Merzouki, H. (2022).** Metallic trace elements in soil : persistence, toxicity, bioaccumulation, and biological remediation. *Nutrition and Human Health*, 55-69.
- **Mironczuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., Malgorzata, E. Z. (2018).** Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in medical sciences*, vol (63), 68-78.
- **Mukherjee, A., Das, D., Mondal, S. K., Biswas, R., Das, T. K., Boujedaini, N., Khuda-Bukhsh, A. R. (2010).** Tolerance of arsenate-induced stress in *Aspergillus niger*, a possible candidate for bioremediation. *Ecotoxicology and environmental safety*, 73(2), 172–182.

N

- **Naik, B. S. (2019).** Functional roles of fungal endophytes in host fitness during stress conditions. *Symbiosis*, vol (79), 99-115.
- **Nouri, M., Haddioui, A. (2016).** Les techniques de dépollution des sols contaminés par les métaux lourds : une revue (the remediation techniques of heavy metals contaminated soils : areview). *Maghrebien journal of pure and applied science*, 2(2), 47-58.
- **Nowicka, B. (2022).** Heavy metal-induced stress in eukaryotic algae-mechanisms of heavy metal toxicity and tolerance with particular emphasis of oxidative stress in exposed cells and the role of antioxidant response. *Environmental science and pollution research*, vol (29), 16860-16911.

O

- **Ogbe, A. A., Finnie, J. F., Van staden, J. (2020).** The role of endophytes in secondary metabolites accumulation in medicinal plants under abiotic stress. *South African journal of botany*, vol (134), 126-134.
- **Oyewole, O. A., Zobeashia, S. S. L. T, Oladoja, E. O., Raji, R. O., Odiniya, E. E., Musa, A. M. (2019).** Biosorption of heavy metal polluted soil using bacteria and fungi isolated from soil. *Sn applied sciences*, 1 (857).

P

- **Paiva, D. S., Fernandes, L., Trovao, J., Mesquita, N., Tiago, I., Portugal, A. (2022).** Unconverging the fungal diversity colonizing limestone walls of a forgotten monument in the central region of Portugal by high-throughput sequencing and culture-based methods. *Applied sciences*, 12(20), 10650.
- **Pala, F. S., Tabakçioğlu, K. (2007).** Free radicals : our enemies or friends. *Advances in molecular biology*, 1(2), 63-69.
- **Palaniappan, P. L. R. M., Karthikeyan, S. (2008).** Bioaccumulation and depuration of chromium in the selected organs and whole body tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala* individually and in binary solutions with nickel. *Journal of environmental Sciences*, vol(21), 229-236.
- **Pathak, A., Kothari, R., Vinoba, M., Habibi, N., Tyagi, V. V. (2021).** Fungal bioleaching of metals from refinery spent catalysts: a critical review of current research, challenges, and future directions. *Journal of environmental management*, vol (280), 111789.
- **Patterson, C. C., Settle, D. M. (1987).** Magnitude of lead flux to the atmosphere from volcanoes. *Geochimica et cosmochimica acta*, 51(3), 675-681.

- **Pincemail, J., Meziane, S. (2022).** On the potential role of the antioxidant couple vitamin e/selenium taken by the oral route in skin and hair health. *Antioxidants*, 11(11), 2270.
- **Prashanth, L., Kattapagari, K. K., Chitturi, R. T., Baddam, V. R. R., Prasad, L. K. (2015).** A review on role of essential trace elements in health and disease. *Journal of dr. ntr university of health sciences*, 4(2), 75-85.
- **Priya, A. K., Gnanasekaran, L., Dutta, K., Rajendran, S., Balakrishnan, D., Soto-moscoco, M. (2022).** Biosorption of heavy metals by microorganisms : evaluation of different underlying mechanisms. *Chemosphere*, 307(4), 135957.

Q

- **Quereshi, S., Paralikar, P., Pandit, R., Razzaghi-Abyaneh, M., Kon, K., Rai, M. (2016).** The microbiology of respiratory system infections : Pulmonary aspergillosis : diagnosis and treatment. Ukraine : academic press. 167-183.

R

- **Rached-Mosbah, O., Gardou, C., Dutuit, P. (1997).** Evolution d'une race tolérante à l'antimoine au sein des populations d'*Hedysarum pallidum* Desf., dans une région minière (Aïn Babouche, Algérie). *Revue science technologie*, vol (8), 99-102.
- **Rahman, Z., Singh, V. P. (2019).** The relative impact of toxic heavy metals (thms) (arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview. *Environmental monitoring and assessment*, 191(419).
- **Rahman, Z., Singh, V. P. (2020).** Bioremediation of toxic heavy metals (thm_s) contaminated sites : concepts, applications and challenges. *Environmental science and pollution research*, vol (27), 27563-27581.
- **Raikwar, M. K., Kumar, P., Singh, M., Singh, A. (2008).** Toxic effect of heavy metals in livestock health. *Veterinary world*, 1(1), 28-30.
- **Raj, S., Mohan, S. (2016).** Impact on proline content of *Jatropha curcas* in fly ash amended soil with respect to heavy metals. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, vol (8), 244–247.
- **Rasheed, S., Raveendran, P. B., Shereefa, L. A. (2023).** Effect of seasonal and altitude variations in the reactive oxygen species production and antioxidant's concentration in *Mangifera indica* L. (var. kottukonam). *Biological forum-an international journal*, 15(2), 177-184.
- **Reis, J. B. A. D., Lorenzi, A. S., do vale, H. M. M. (2022).** Methods used for the study of endophytic fungi : a review on methodologies and challenges, and associated tips. *Archives of microbiology*, 204(675).

- **Rivelli, V., Franzetti, A., Gandolfi, I., Cordoni, S., Bestetti, G. (2012).** Persistence and degrading activity of free and immobilized allochthonous bacteria during bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils. *Biodegradation*, 24(1), 1-11.

S

- **Saif, F. A., Yaseen, S. A., Alameen, A. S., Mane, S. B., Undre, P. B. (2021).** Identification and characterization of *Aspergillus* species of fruit rot fungi using microscopy, ft-ir, raman and uv-vis spectroscopy. *Spectrochimica acta part a : molecular and biomolecular spectroscopy*, vol (246), 119010.
- **Seshadri, B., Bolan, N. S., Naidu, R. (2015).** Rhizosphere-induced heavy metal (loid) transformation in relation to bioavailability remediation. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15(2), 524-548.
- **Sies, H. (2020).** Oxidative stress : concept and some practical aspects. *Antioxidants*, 9(9), 852.
- **Singh, J., Kalamdhad, A. S. (2011).** Effects of heavy metals on soil, plants, human health and aquatic life. *International journal of research in chemistry and environment*, 1(2), 15-21.
- **Sun, W., Cheng, K., Sun, K. Y., Ma, X. (2021).** Microbially mediated remediation of contaminated sediments by heavy metals : a critical review. *Current pollution reports*, vol (7), 201-212.
- **Surai, P. F., Kochish, I. I., Fisinin, V. I., Kidd, M. T. (2019).** Antioxidant defence systems and oxidative stress in poultry biology : an update. *Antioxidants*, 8(7), 235.

T

- **Tarekegn, M. M., Salilih, F. Z., Ishetu, A. I., Yildiz, F. (2020).** Microbes used as a tool for bioremediation of heavy metal from the environment. *Cogent food and agriculture*, 6(1).
- **Tarfeen, N., Nisa, KH. U., Hamid, B., Bashir, Z., Yattoo, A. M., Dar, M. A., Mohiddin, F. A., Amin, Z., Ahmad, R. A., Sayyed, R. Z. (2022).** Microbial remediation : a promising tool for reclamation of contaminated sites with special emphasis on heavy metal and pesticide pollution : a review. *Processes*, 10(7), 1358.
- **Terna, P. T., Nor, N. M. I. M., Zakaria, L. (2021).** Endophytic *Aspergillus* species from corn kernels in peninsular Malaysia. *Iop conference series : earth and environmental science*, vol (711), 012026.
- **Thakur, M. (2018).** Mushrooms as a biological tool in mycoremediation of polluted soils. *Emerging issues in ecology and environmental science*, 27-42.
- **Theron, A. J., Tintinger, G. R., Anderson, R. (2012).** Harmful interactions of non-essential heavy metals with cells of the innate immune system. *Clinical toxicology*, 3(005).

- **Tilwankar, V., Rai, S., Bajpal, S. P. (2018).** A review on contamination profile of heavy metals and its role in environment. *Plant Archives*, 18(2), 1239-1247.

U

- **Uddin, M. K. (2017).** A review on the adsorption of heavy metals by clay minerals, with special focus on the past decade. *Chemical engineering journal*, vol (308), 438-462.
- **Ukaogo, P. O., Ewuzie, U., Onwuka, CH. V. (2020).** Microorganisms for sustainable environment and health : environmental pollution : cases, effects, and the remedies. *Nigeria*.419-429.

V

- **Verma, R., Dwivedi, P. (2013).** Heavy metal water pollution-a cause study. *Recent research in science and technology*, 5(5), 98-99.
- **Verma, S., Verma, P. K., Chakrabarty, D. (2019).** Arsenic bio-volatilization by engineered yeast promotes rice growth and reduces arsenic accumulation in grains. *International journal of environmental research*, vol (13), 475-485.
- **Vidya, M. A., Krishnanand, P. S., Shah, M. N. (2022).** Role of free radicals and reactive oxygen species in biological systems-acomprehensive review. *International journal of drug research and dental science*, 4(3), 28-41.

W

- **Wu, X., Cobbina, S. J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., Yang, L. (2016).** A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environmental science and pollution research*, vol (23), 8244-8259.

Y

- **Yaakoub, H., Mina, S., Calenda, A., Bouchara, J., Papon, N. (2022).** Oxidative stress response pathways in fungi. *Cellular and molecular life sciences*, 79(333).
- **Yadav, P., Rai, S. N., Mishra, V., Singh, M. P. (2021).** Mycoremediation of environmental pollutants: a review with special emphasis on mushrooms. *Environmental Sustainability*, vol (4), 605-618.
- **Yan, L., Zhu, J., Zhao, X., Shi, J., Jiang, C., Shao, D. (2019).** Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. *Applied microbiology and biotechnology*, vol (103), 3327-3340.

Z

- **Zandi, P., Schnug, E. (2022).** Reactive oxygen species, antioxidant responses and implications from a microbial modulation perspective. *Biology*, 11(2), 155.
- **Zeggai, F. Z. N. H. (2020).** La contamination de l'eau par les métaux lourds. Mémoire de master : Toxicologie Industrielle et Environnemental. Tlemcen : Université Abou-bekerbelkaid – Tlemcen, 74 p.
- **Zhang, J., Li, H., Zhou, Y., Dou, L., Cai, L., Mo, L., You, J. (2018).** Bioavailability and soil-to-crop transfer of heavy metals in farmland soils: A case study in the Pearl River Delta, South China. *Environmental pollution*, vol(235), 710-719.
- **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), 350.
- **Zhang, R., Wilson, V. L., Hou, A., Meng, G. (2015).** Source of lead pollution, its influence on public health and the counter measures. *International journal of health animal science and food safety*, 2(1), 18-31.
- **Zhao, S., Zhou, N., Zhao, Z. Y., Zhang, K., Wu, G. H., Tian, C. Y. (2016).** Isolation of endophytic plant growth-promoting bacteria associated with the halophyte *Salicornia europaea* and evaluation of their promoting activity under salt stress. *Cur microbial*, vol (73), 574-581.
- **Zulfiqara, U., Farooqa, M., Hussaina, H., Maqsooda, M., Hussaind, M., Ishfaqa, M., Ahmada, M., Anjum, M. Z. (2019).** Lead toxicity in plants: Impacts and remediation. *Journal of environmental management*, vol (250), 109557.

Annexe



Oxidative and antioxidative responses to antimony stress by endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* isolated from antimony accumulator *Hedysarum pallidum* Desf.

Ouissem Meghnous¹ · Laid Dehimat² · Patrick Doumas³ · Mounia Kassa-Laouar¹ · Fawzia Mosbah¹ · Oualida Rached⁴

Received: 5 January 2019 / Accepted: 10 July 2019 / Published online: 30 July 2019
© Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences 2019

Abstract

Antimony (Sb) is a toxic metalloid whose pollution has become a serious problem. However, studies on fungal endophytes resistant to antimony are virtually nonexistent. An endophytic fungal strain was isolated for the first time from the roots of *Hedysarum pallidum* Desf. which is a Sb accumulator *Fabacea* growing on mine cuttings. Experiments with high Sb increased concentrations (0, 5, 10, 20 and 30 mM Sb) were performed in order to assess the strain potential in contaminated environments bioremediation and to understand its Sb tolerance strategy. The isolated strain was identified as *Aspergillus tubingensis* MH189391 by morphological characteristics and phylogenetic analysis. It exhibited a minimum inhibitory concentration (MIC) of 500 mM Sb, i.e. 60,880 mg L⁻¹, and maintained high amounts of biomass up to 30 mM Sb, i.e. 3652.8 mg L⁻¹ of Sb. A stimulation of *A. tubingensis* growth and its antioxidant responses was observed at the level of 5 mM Sb, i.e. 609 mg L⁻¹. Hydrogen peroxide (H₂O₂) and malondialdehyde (MDA) contents increased significantly ($p < 0.05$) with Sb treatments. Oxidative stress induced significant increases ($p < 0.05$) in antioxidant biomarkers such as proline, catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD), but it resulted in a significant decrease of peroxidase (POD) and ascorbate peroxidase (APX) activities. Proline, CAT, SOD, H₂O₂ and MDA were significantly ($p < 0.05$) and positively correlated, which highlights their coactions in oxidative stress fighting. Results indicate that *Aspergillus tubingensis* has developed an important adaptation to excessive Sb concentrations and that it could be used in antimony-contaminated environments bioremediation.

Keywords Metalloid · Antioxidants · Endophyte · Fungus · Mine cuttings

Abbreviations

APX Ascorbate peroxidase
CAT Catalase
MDA Malondialdehyde
MIC Minimum inhibitory concentration

p Probability value
PCR Polymerase chain reaction
POD Peroxidase
r Correlation coefficient
ROS Reactive oxygen species
SEM Standard error of the mean
Sb Antimony
SOD Superoxide dismutase

✉ Oualida Rached
o.rached@ensbiotech.edu.dz; oualida.rached@hotmail.fr

- ¹ Biology and Environment Laboratory, Faculty of Nature and Life Sciences, Mentouri University, Constantine 1, Constantine, Algeria
- ² Mycology, Biotechnology and Microbial Activity Laboratory, Mentouri University, Constantine 1, Constantine, Algeria
- ³ BPMP, CNRS, INRA, Montpellier SupAgro, University of Montpellier, Montpellier, France
- ⁴ Biotechnology High National School Taoufik Khaznadar, Ali Mendjeli University City, B.P. E66, 25100 Constantine, Algeria

Introduction

Antimony (Sb) is a toxic metalloid existing in trace amounts in uncontaminated soils where it ranges in average from 0.3 mg kg⁻¹ to 8.4 mg kg⁻¹ (Clemente 2013). Sb was considered as a priority Pollutant by the United States Environmental Protection Agency (Zhou et al. 2018). A few decades ago, Sb pollution was relatively localized and concerned mining areas

and the surroundings of some industries mainly. But in the last 30 years, this metalloid has become a widespread pollutant. In fact, according to Mubarak et al. (2015), soil contamination by antimony due to human activities has considerably increased in the recent past. Sb uses by man are numerous and very diverse. The main use of Sb is as a hardener for lead in lead-acid batteries, cable sheaths and ammunition and as an important component in semiconductors. Large amounts of Sb (such as antimony trioxide Sb_2O_3) are used as flame retardants in textiles, paper, plastics and adhesives without any prospects for the development of alternative materials. Sb is also used in ceramics as an opacifier, in paints as a mordant, in brake linings, in pest control agents, in polyethylene terephthalate (PET) plastics and as an additive in the tire vulcanization process (Clemente 2013; Pierart et al. 2015).

Antimony pollution increase may constitute a serious threat to human health and to other living organisms. The development of Sb removal biotechnologies of contaminated sites is therefore necessary. Bioremediation, in situ treatment, provides a safe and economic alternative to the physicochemical strategies commonly used (Ma et al. 2016). Metal accumulating plants harbor in their roots microorganisms, known as endophytes, with potential to accumulate metals from polluted environment and to enhance metal uptake by plants (Ma et al. 2016). Thus, such endophytes, or both endophytes and their hosts, could be used in metalloid polluted environments bioremediation. In the host-endophytic association, host tolerance to abiotic stress is enhanced by an increase in antioxidant activity by the symbiont whose antioxidants production is also increased (Devi et al. 2017). Such an increase in antioxidants by the endophyte is a sign of its resistance to the prooxidants involved. Thus, the measurement of the antioxidants produced by an endophyte exposed to a metal stress would highlight its degree of resistance to the metal involved and therefore its possible use in the bioremediation of metal contaminated environments. However, the antioxidant system role in fungi resistance towards this metalloid remains virtually nonexistent.

In the Djebel Hamimat area (southeast of Constantine, Algeria) an abandoned mining exploitation has generated important quantities of soils containing various toxic metals, mainly antimony whose concentration reached $81.446 \text{ mg kg}^{-1}$ (Benhamdi et al. 2014). In this area, a chemical analysis of a metallophyte, *Hedysarum pallidum* Desf., carried out by the authors in question highlighted up to 263 mg kg^{-1} of Sb in its aerial parts and 183 mg kg^{-1} in its underground parts. The above authors showed that this species exhibited significant antioxidant enzymatic activities in its two parts to fight oxidative stress generated by metallic pollution. Thus, it is possible that this plant harbors endophytic fungi in its roots that would help it to tolerate high levels of this metalloid in its tissues. Such endophytes could be resistant to antimony high levels and present a powerful antioxidant

defense system that make them potential candidates for bioremediation of antimony-contaminated environments.

The purpose of the present work is to highlight and identify the most antimony tolerant endophytic fungus from *H. pallidum* roots by determining its MIC. The goal is also to determine the strain tolerance strategy to Sb by studying the metalloid impact on the antioxidant biomolecules induction. Results would determine the strain's ability to bioremediation of contaminated environments by this metalloid.

Materials and methods

Site characteristics and plant sampling

The study area is located 90 km away from Constantine, more precisely in the province of Oum El Bouaghi, a semiarid region in the northeast of Algeria with the following geographical coordinates: $35^{\circ}58'37.64'' \text{ N } -7^{\circ}11'22.80'' \text{ E}$ to $36^{\circ}01'09.78'' \text{ N } -7^{\circ}14'38.38'' \text{ E}$ (Benhamdi et al. 2014). In this area, an old abandoned antimony surface mine is situated on the side of a mountain (Djebel Hamimat) with an average altitude of 865 m (Bentellis et al. 2014).

Soils and plant roots were taken from the most contaminated spoil of the study area. The soils showed the following physicochemical characteristics: $62,000 \text{ mg kg}^{-1} \pm 4,924$ Sb, $2,300 \text{ mg kg}^{-1} \pm 186$ As, $0.9 \pm 0.04\%$ Organic matter (OM), $\text{pH } 8.01 \pm 0.09$, $7.8 \pm 1.82\%$ CaCO_3 , $23.0 \pm 4.9\%$ Clay, $16.3 \pm 1.02\%$ Silt, $53.7 \pm 3.22\%$ Sand (Benhamdi et al. 2014).

Eight specimens of *H. pallidum* were randomly chosen from the analyzed spoil. The roots of each specimen were extracted with sterile auger, taken with sterile gloves and put in sterile flasks after being separated from the aerial part by sterile scissors.

Isolation and selection of endophytes resistant to antimony

In order to isolate fungal endophytes, *H. pallidum* roots were washed with sterile water to remove soil particles, then immersed successively in 75% (v:v) ethanol solution for 2 min and in sodium hypochlorite (35° Chlorine) at 5% for 1 min, finally, washed in sterile water three times to remove the surface sterilization agents. After the last rinse and to check the effectiveness of the disinfection, 0.3 mL of the final rinse water were inoculated into the potato dextrose agar (PDA) medium supplemented with gentamicin and incubated at 30 °C. The absence of any fungal growth on this medium indicated that all the fungi that have been isolated are endophytes (Deng et al. 2011). After that, the washed roots were cut into small pieces, placed on PDA medium and incubated at 30 °C for 1 to 2 weeks. After incubation, the obtained strains were transplanted several times on PDA

medium in order to be purified. The purified strains were stored at 4 °C (Deng et al. 2011).

To screen the antimony resistant fungal endophytes, the obtained isolates were grown on Sabouraud agar containing per liter of medium: 10 g peptone, 20 g glucose, 20 g agar, and increasing amounts of antimony in the form of tartrate ($C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$ from Sigma-Aldrich). The pH of the medium was maintained at 6.4 before autoclaving (Mukherjee et al. 2010). The selection cultures were incubated at 30 °C for 96 h. The fungal growth was monitored daily by reference to the control (Sabouraud agar culture without addition of metal). The lowest concentration of the metalloid, which completely inhibits the growth of the isolates, was considered as the minimal inhibitory concentration (MIC).

Resistant strain identification

The resistant isolate was identified by the cultural, morphological characteristics and analysis of the sequences of the calmodulin gene, TUB1/TUB2 (5 'TCGACAGCTATTTC CCCCTT 3') / (5 'TAGCATGTCATATCACGGGCAT 3') by PCR amplification of specific primers.

The sequences obtained after sequencing at Eurofins/ Genomics Laboratory (Germany) were subjected to a sequence homology search using the BLAST program at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) to search for the closest sequences deposited in Genbank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). For this purpose, the sequences of the calmodulin gene were aligned with the sequences of the similar fungi retrieved from the databases using CLUSTAL X, and a phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method (MEGA version 7).

Preparation of fungal biomass for the determination of Sb toxicity biomarkers

The biomass of the resistant strain was obtained from submerged cultures in the modified Sabouraud broth, composed of 50 mM citrate buffer (pH 6.4): 10 g peptone and 20 g glucose, per liter.

The total volume, 50 mL of buffered Sabouraud broth, was transferred to 250 mL Erlenmeyer flasks. The broth medium was inoculated with spores of the resistant strain and then incubated at 30 °C for 96 h in a rotary incubator at 175 rpm (New Brunswick Scientific, Co., Inc., NJ, USA).

For the biomarkers determination, four media were prepared, aseptically and separately, by supplementing Sabouraud broth with Sb increasing amounts (5, 10, 20 and 30 mM) in tartrate form. A control medium was prepared with buffered Sabouraud broth without any Sb additions. The maximum dose was determined by the minimum amount of biomass necessary to perform the biomarker toxicity analysis. The biomass was recovered after a 96 h incubation, after

filtration and rinsing with sterile bi-distilled water. It was then stored at –20 °C until use (Mukherjee et al. 2010).

The pH variations before inoculation and after obtaining the biomass were stabilized by the addition of citrate buffer to the culture media according to the method of Chakraborty et al. (2014).

Intracellular H_2O_2 assay

The intracellular H_2O_2 content was measured according to the method described by Chakraborty et al. (2014). The fresh mycelia (0.5 g) were homogenized in an ice bath with 5 mL of 0.1% TCA (w:v). The homogenate was centrifuged at 12000×g for 15 min, then 0.5 mL of the supernatant was added to 10 mL of the phosphate buffer (0.5 mM, pH 7.0) and 1 mL of the 1 M KI. The absorbance was read at 390 nm. The H_2O_2 contents were determined from a standard curve.

Malondialdehyde (MDA) assay

The MDA was assayed following the method used by Benhamdi et al. (2014) in order to evaluate the level of lipid peroxidation. Fresh biomass (0.5 g) was crushed in liquid nitrogen and homogenized with a 5 mL solution containing 20% trichloroacetic acid (TCA) and 0.5% thiobarbituric acid (TBA). The mixture was incubated at 95 °C for 30 min and the reaction was stopped by immersing the tubes in ice. The cooled mixture was centrifuged at 5000×g for 10 min at 25 °C. The non-specific absorbance at 600 nm was subtracted from the absorbance at 532 nm and the MDA concentration was determined by its molar extinction coefficient: $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. It was expressed in $\mu\text{M g}^{-1}$ of fresh biomass.

Intracellular proline assay

The intracellular proline content was determined by the method adopted by Zhang et al. (2011). Fresh biomass (0.1 g) was ground in an ice bath. Then, 2 mL of 40% methanol (v:v) were added after incubation at 85 °C for 60 min and cooled to room temperature. After decantation, 1 mL of the supernatant was mixed with 2 mL of acetic acid, 25 mg ninhydrin and 1 mL of a mixture containing: acetic acid, distilled water and orthophosphoric acid (120:300:80; v:v:v). The mixture was boiled for 30 min and then placed in an ice bath to stop its reaction. In order to allow the phase separation, toluene was added to the mixture and stirred vigorously. The intensity of the red color of the upper phase was read at 528 nm. The concentration of proline was determined using the extinction coefficient $0.62 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ relative to the fresh weight.

Antioxidant enzyme activities assay

For antioxidant enzyme activities measures, the fresh biomass of the resistant fungal strain (0.5 g) was ground into a fine powder with a mortar in liquid nitrogen. The proteins were then extracted at 4 °C with 3 mL of cold potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) containing 0.1% triton X-100 (v:v) and 1% polyvinylpyrrolidone (PVP) (w:v). The homogenate was centrifuged at 14000×g at 4 °C for 15 min and the supernatant was used to measure antioxidant activities (Mukherjee et al. 2010).

Protein concentrations were quantified according to Lowry et al. (1951) method, using BSA (*bovine serum albumin*) as a standard.

The activity of catalase (CAT) (EC.1.11.1.6) was measured according to the method of Chance and Maehly (1955). The decomposition of hydrogen peroxide was determined by its absorbance decrease at 240 nm ($\epsilon = 39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The activity of CAT was expressed in $\mu\text{M min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteins.

The total activity of SOD (EC.1.15.1.1) was evaluated according to the method of Marklund and Marklund (1974) by its ability to inhibit autoxidation of pyrogallol at 420 nm. The SOD unit was defined as the amount of enzyme required to cause 50% inhibition of pyrogallol autoxidation.

The POD activity (EC.1.11.1.7) was quantified according to the method of Chance and Maehly (1955); the amount of purpurogallin formed between H_2O_2 and pyrogallol was measured at 420 nm and the enzymatic activity was expressed as $\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteins.

The activity of APX (EC.1.11.1.11) was measured according to the method of Nakano and Asada (1980) by decreasing in the absorbance of oxidized ascorbate in the presence of H_2O_2 at 290 nm ($\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The enzymatic activity was expressed in $\mu\text{M min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteins.

Statistical analysis

The obtained data for the different tested biomarkers at increased Sb concentrations were presented in bar graphs and correspond to means (\pm SEM) of 3 repetitions. The significance of the differences between the means, at the level of $p < 0.05$, was estimated using a variance analysis (ANOVA) followed by the Tukey's test. The relationships between all analyzed variables and between those and Sb concentrations of the medium were tested by the Pearson correlation coefficients (r). The data treatment was carried out using XLStat software (XLStat 2014, Addinsoft, Paris, France).

Results

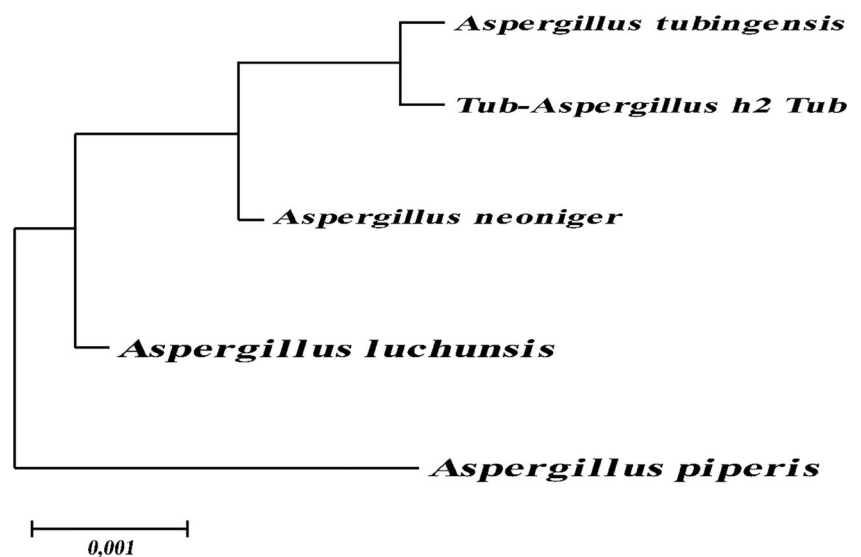
Antimony-resistant strain identification

Of the 36 endophytic strains isolated from the roots of *Hedysarum pallidum* Desf., only the isolate Tub-H2 was able to grow up to 500 mM Sb. This strain showed a rapid growth at 28–30 °C by covering the agar without Sb with a white powder at the beginning of the growth which became black during the development. The mycelium has distinct septa and black brown spores. The morphological and cultural characteristics of this isolate allowed its affiliation to the genus *Aspergillus*.

The analysis of the calmodulin gene sequences indicated that the resistant strain Tub-H2 was affiliated to *Aspergillus tubingensis* with a 100% similarity (Fig. 1).

Thus, the morphological and phylogenetic characteristic identification makes it possible to conclude that the resistant strain is *Aspergillus tubingensis* MH189391.

Fig. 1 Phylogenetic tree according to distance method (Neighbor-Joining) based on the analysis of calmodulin gene sequences using Mega (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) software showing the phylogenetic position of the Tub-H2 isolate



Antimony effect on fungal biomass

Biomass of *Aspergillus tubingensis*, represented by its dry weight (Fig. 2a), decreased significantly with the increase of Sb concentrations. It was very significantly and negatively correlated with the metalloid concentrations (Table 1). At 5 mM Sb, *A. tubingensis* biomass increased significantly by 25% compared to the control and was

significantly higher than the biomass obtained with all the Sb concentrations.

Intracellular H₂O₂ contents

The intracellular H₂O₂ contents of *A. tubingensis* (Fig. 2b) did not present significant increases at 5, 10 and 20 mM Sb, compared to the control. At 5 mM Sb, they were

Fig. 2 Dry weight and Biochemical responses measures, according to Sb concentrations, in the endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* isolated from roots of *Hedysarum pallidum* Desf. **a** dry weight, **b** H₂O₂ contents, **c** MDA contents, **d** Proline contents, **e** CAT activities, **f** SOD activities, **g** POD activities, **h** APX activities. Values represent means ± SEM (N = 3). Different letters discriminate statistical differences between the measured parameters at the different antimony (Sb) concentrations (using ANOVA followed by Tukey’s test, p < 0.05)

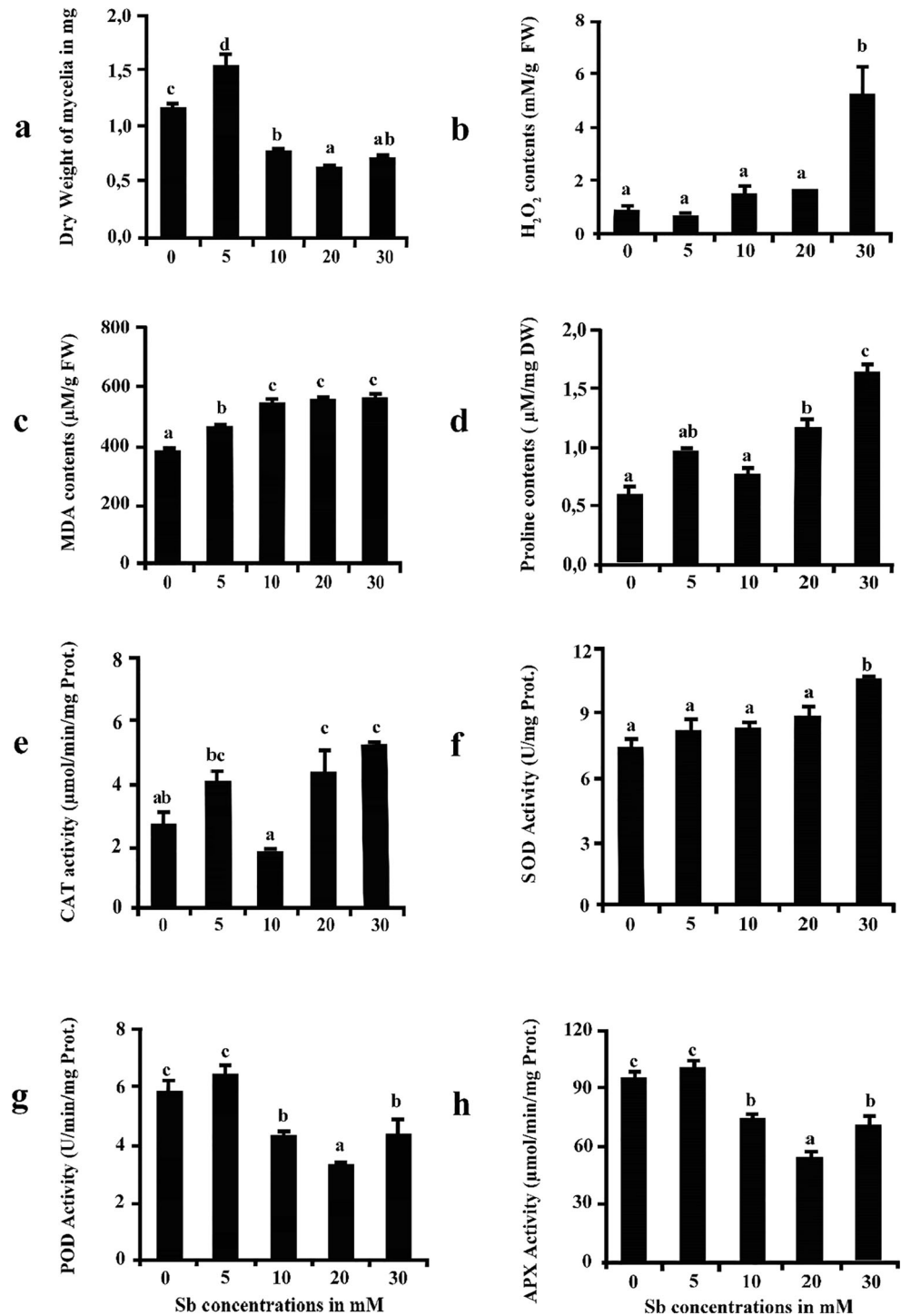


Table 1 Pearson correlation coefficients between all analyzed variables and between those and antimony culture medium concentrations

	Dry weight	H ₂ O ₂	MDA	Proline	CAT	SOD	POD	APX
Sb (mM)	−0,710**	0,868***	0,841***	0,934***	0,688**	0,919***	−0,656**	−0,745**
Dry weight	1	−0,535*	−0,706**	−0,436	−0,096	−0,498*	0,927***	0,911***
H ₂ O ₂		1	0,611*	0,858***	0,605*	0,883***	−0,424	−0,456
MDA			1	0,704**	0,372	0,711**	−0,712**	−0,800**
Proline				1	0,850***	0,711**	−0,395	−0,511*
CAT					1	0,755**	−0,152	−0,277
SOD						1	−0,451	−0,525*
POD							1	0,932***

* $p < 0.05$; ** $p < 10^{-2}$, *** $p < 10^{-3}$ ($n = 15$)

slightly lower than those of the control, whereas at 10 and 20 mM Sb they showed an increase of 174% and 197% respectively, compared to the control. At 30 mM Sb, the intracellular H₂O₂ contents were significantly higher than the control that they exceeded by 631%. They were very significantly and positively correlated with Sb concentrations in media but negatively and significantly with strain's dry weight (Table 1).

MDA contents

The MDA contents of *A. tubingensis* (Fig. 2c) increased significantly at 5 and 10 mM Sb compared to the control. At 5 mM Sb they exceeded those of the control only by 30%, whereas at 10 mM Sb they exceeded it by 44%. From 10 to 30 mM Sb, MDA contents of the strain remained significantly invariable. They showed positive and very significant correlation with media Sb concentrations, significant positive correlation with strain's H₂O₂, but significant negative correlation with the strain dry weight (Table 1).

Intracellular proline contents

The proline contents of *A. tubingensis* (Fig. 2d) increased significantly at 5 mM Sb. They were 69% higher than that of the control, and significantly closer to the contents obtained at 20 mM Sb level, while at 10 mM Sb, they decreased to be also closer to the control, remaining 28% higher.

The proline levels increased significantly at 20 and 30 mM Sb, exceeding those of the control by 97.50% and 177% respectively. In general, the appearance of the diagram showed a progressive increase in proline levels with increasing Sb, except at 5 mM Sb where a significant increase in proline contents was observed compared to 0 and 10 mM. Moreover, they were very significantly and positively correlated with media Sb concentrations strain's H₂O₂ and MDA contents, but

negatively correlated, although not significantly, with strain's dry weight (Table 1).

Antioxidant enzyme activities

Overall, it appears (Fig. 2e) that CAT activities increased progressively and significantly according to Sb concentrations in culture media except at 5 mM Sb. At this concentration, as for proline level, the CAT was significantly higher than that measured at 0 and 10 mM Sb and was close to activities measured at 20 and 30 mM Sb. These latter exceeded that of the control by 163% and 197% respectively. CAT activities showed positive and significant to very significant correlations with Sb concentrations, with strain's H₂O₂ and proline contents. They also showed positive correlation, although not significant, with MDA contents, and no correlation with strain's dry weight (Table 1).

SOD activities of *A. tubingensis* increased steadily, but not significantly, from 0 to 20 mM Sb (Fig. 2f). It was only at 30 mM Sb that the SOD presented an activity significantly higher than the control. However, SOD activities showed very significant positive correlations with Sb concentrations, H₂O₂, MDA, proline contents and CAT activities, but, significant negative correlations with strain's dry weight and APX activities. They also showed almost significant negative correlation with POD activities (Table 1).

The diagrams of POD and APX activities showed a very similar general aspect. They also had a important similarity to the biomass diagram. POD and APX activities (Fig. 2g and h) revealed a slight increase of 111% and 106% respectively at 5 mM Sb. Then they showed significant decrease from 10 mM Sb, compared to the control. However, the decrease at 30 mM of Sb (i.e. 3,653 mg L^{−1}) was respectively only 22% and 29% of that the control.

Both enzymes had very significant positive correlations between them and with strain's dry weight. They exhibited significant to almost significant negative correlations with

Sb concentrations, MDA, H₂O₂, proline contents, and SOD activities (Table 1).

Discussion

Aspergillus tubingensis, isolated for the first time from the roots of a steppic antimony accumulator plant *Hedysarum pallidum* Desf., growing on Sb mine spoils, proves to be a real endophyte, because it was also isolated from the roots of another species, *Pongamia pinnata*, by Huang et al. (2010), and from tissues of Mangrove trees by Bacal and Yu (2017).

Toxicity in vitro tests showed that *A. tubingensis* was tolerant at concentrations up to 500 mM Sb, namely 60,880 mg L⁻¹, which corresponds to the maximum level of Sb determined in the mining region (Benhamdi et al. 2014). Such a resistance level does not appear to be an exceptional character of this strain since Qayyum et al. (2016) already demonstrated its resistance to heavy metals.

The toxic effect of Sb on *A. tubingensis* was highlighted by the significant decrease of its biomass according to Sb concentrations increase. It was also evidenced by the very significant negative correlation of its biomass with Sb concentrations. The biomass decrease can be explained by the physiological mechanisms modification of tested strain in response to Sb toxicity. In fact, according to Chakraborty et al. (2012, 2014), non-lethal metallic amounts induce a disturbance in the membrane permeability of the fungal cell and consequently a significant loss of essential nutrients for fungal growth. However, *A. tubingensis* still preserved a significant biomass (61% of the control) at 30 mM Sb, namely 3,653 mg L⁻¹ Sb. Such a result shows an important resistance of this strain to Sb toxicity.

The significant increase in biomass at 5 mM Sb compared to the control (0 mM Sb), instead of its decrease, shows that the strain's growth was stimulated by the presence of Sb. The concentration of 5 mM, ie 609 mg L⁻¹, is relatively high since the normal levels of Sb in soils are inferior to 8 mg kg⁻¹ (Clemente 2013). It is also much higher than the maximum Sb content (183 mg kg⁻¹) determined in the roots of *H. pallidum* from which *A. tubingensis* was isolated (Benhamdi et al. 2014). Such a result suggests that the adaptation of this fungal strain to excessive Sb levels in the natural environment has resulted in this element becoming necessary for its development at a relatively high threshold concentration. Beyond this threshold, Sb becomes toxic for the strain by reducing its growth, but its toxicity remains low since the strain still had an important biomass.

The toxicity of antimony in the medium induced the formation of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H₂O₂). This was evidenced by the very significant positive correlation of Sb concentrations with H₂O₂ contents. However, it was only from 30 mM Sb that the production of H₂O₂ became important by being significantly higher than the

control. Indeed, H₂O₂ contents produced at the lowest concentrations (5, 10 and 20 mM Sb) were not significantly different from that of the control medium (0 mM Sb). As a result, the oxidative stress generated by antimony toxicity become significant only from 30 mM Sb, indicating an important resistance of the strain to concentrations below this level, but which are still very high.

The ROS, including H₂O₂, induced by Sb treatments, have involved a lipid peroxidation (LPO) of the polyunsaturated fatty acids, of which the final product is malondialdehyde (MDA). Such a result is highlighted by the very significant positive correlation of H₂O₂ contents with MDA.

MDA is a reliable indicator of free radical formation. It is used as a biomarker of toxicity in a variety of living organisms (Tsikas 2017). It indicates membrane damage leading to a disruption of the metabolic function and a reduction of cellular integrity, thus a decrease in growth. Such an effect, in the case of *A. tubingensis*, is highlighted by the significant negative correlations of the strain dry weight with its H₂O₂ and MDA contents and with the media Sb concentrations. These results are in accordance with the work of Mukherjee et al. (2010) which showed that lipid peroxidation increased steadily with the increase of arsenate amounts in *Aspergillus niger*. Similarly, Chakraborty et al. (2014) indicated that the peroxidation of *Aspergillus foetidus* cell membrane induced by cadmium, caused damages in cell wall.

The same results were observed by Benhamdi et al. (2014), they illustrated that MDA increased with soil Sb concentrations in the roots of *H. pallidum* Desf. from which *A. tubingensis* was isolated. This finding indicates a close relationship between the host plant and its endophyte.

The low MDA contents at 5 mM Sb would have caused insignificant membrane damage at this concentration, which explain the important biomass obtained at 5 mM than at 10, 20 and 30 mM Sb. However, contrary to H₂O₂ contents, MDA contents determined at the concentrations of 5, 10 and 20 mM Sb, were significantly higher than that of the control. This could be explained by the fact that other ROS than H₂O₂ were involved in the production of MDA.

The very significant and positive correlations of proline contents of *A. tubingensis* with Sb treatments, strain's H₂O₂ and MDA contents indicate that the intracellular proline increase with Sb concentrations of the medium, H₂O₂ and MDA contents. Such an increase shows that the production of proline was triggered by the presence of the ROS generated by the metalloid toxicity. It suggests that proline is involved in H₂O₂ removal and in preventing the lipid peroxidation. Furthermore, the negative correlation of proline with fungal growth suggests that this reduction, due to Sb toxicity, would be the inducing factor of proline production. Therefore, *A. tubingensis* produces intracellular proline to struggle the metalloid toxicity, reduce its deleterious effects on the metabolism, and prevent the reduction of the fungus growth. This

indicates an important adaptation of the fungal strain to the excessive contents of Sb. This adaptation seems more important at 5 mM Sb since the strain's proline contents are higher than at 0 and 10 mM Sb. Indeed, according to Raj and Mohan (2016), high levels of intracellular proline are specific characteristics of hypertolerant heavy metal populations. They suggest that intracellular proline have a functional role in high resistance to metals. The obtained results are corroborated by the works of Chakraborty et al. (2012, 2014): when studying the behavior of *Aspergillus foetidus* according to Pb (II) and Cd toxicity, they found out that intracellular proline increased in a gradual and significant way with that of the two elements in the medium.

Very significant positive correlations of proline with CAT and SOD suggest that proline production is related to the induction of these enzymatic activities. Indeed, according to the works of Zouari et al. (2016), on date palm (*Phoenix dactylifera* L. cv Deglet Nour), proline intervenes in alleviation of cadmium stress by promoting CAT activity. Not only could this be the case for *A. tubingensis* for CAT but also for SOD.

The significant increase in CAT activity with Sb treatments and H₂O₂ contents and their very significant positive correlations show that CAT activity is triggered by H₂O₂ contents, which are induced by Sb toxicity. It suggests that CAT is involved in H₂O₂ removal. In fact, catalases are known to be implied in one of the mechanisms that protect cells against cellular components damages caused by H₂O₂ and reactive oxygen species (ROS) (Teng et al. 2018). Moreover, according to these authors, catalase activity is directly regulated by H₂O₂ concentrations in the medium. So, the H₂O₂ formed by Sb toxicity would be eliminated by CAT, produced by *A. tubingensis*, that neutralizes or reduces its toxic effects. Such a result indicates an important adaptation of the fungal strain to the presence of excess Sb in the medium. This adaptation seems more accentuated at 5 mM Sb since CAT activity is higher than at 0 and 10 mM Sb. As it was for MDA, the CAT activity of the plant *H. pallidum*, had increased significantly with the increase of antimony pollution in soil (Benhamdi et al. 2014). Such an increase could therefore be related to the presence of *A. tubingensis* in *H. pallidum* roots.

Superoxide dismutase (SOD) is another antioxidant enzyme that protects cells against oxidative stress. Thus, the increase of SOD activity in *A. tubingensis* with increased Sb treatments, which are correlated significantly and positively, prove that the metalloid induced SOD activity of the strain.

Indeed, according to Demidchik (2015), SOD reacts with superoxide radicals (O₂^{•-}) to produce H₂O₂ and O₂. The production of H₂O₂ by SOD makes it possible to reduce the amount of O₂^{•-} produced by the stress and thus to prevent the formation of hydroxyl radicals (OH[•]) in the Haber-Weiss reaction. These hydroxyl radicals are the most reactive species causing LPO, consequently, MDA production. Therefore, the

very significant positive correlations of SOD with H₂O₂ and MDA suggest that SOD is involved in H₂O₂ and MDA production, so, in LPO prevention.

The H₂O₂, which is also an oxidant, would be eliminated by intracellular proline and CAT. This, therefore, explains the very significant positive correlations found between SOD, CAT activities, H₂O₂ and proline contents.

Benhamdi et al. (2014) also highlighted an increase in SOD activity of *H. pallidum* according to Sb contamination in soils. In addition, it was more important in *H. pallidum* roots than in its aerial parts. This suggests that *A. tubingensis* could play a role in increasing SOD activity of its host.

POD and APX belong to a group of oxidoreductases found in fungi which mediate electron transfer from hydrogen peroxide (H₂O₂) and organic peroxide to various electron acceptors (Choi et al. 2014). Consequently, the similarity of POD and APX activities graphs and their very significant positive correlation could be explained by the fact that they intervene in the same type of reaction.

Significant decrease of both POD and APX activities with increased Sb concentration and the very significant and negative correlations of these enzymes with Sb treatments highlight a relative inhibition of POD and APX activities by Sb toxicity. Such inhibition could be linked to the excessive H₂O₂ production, hence explaining the negative correlations of both enzymes activities with the strain's H₂O₂ contents. Indeed, according to Demidchik (2015), peroxidases could be inactivated by their substrate, hydrogen peroxide. Similarly, Feng et al. (2016) noted a reduction in APX and POD activities of paddy rice roots exposed to antimony and selenium. The low correlation between both enzymes activities and H₂O₂ contents may be explained by the fact that other ROS, such as hydroxyl radicals, would be involved in the inactivation of *A. tubingensis*'s peroxidases.

The very significant and negative correlations between MDA contents and both enzymes suggest that they are not involved in the LPO prevention.

Since peroxidases monitor a large variety of fundamental biological processes (Demidchik 2015), their inactivation inevitably leads to reduce the growth of *A. tubingensis*. This would explain the very significant positive correlations between both enzyme activities and the strain's dry weight.

Despite their decreases, the activities of the POD and the APX are still relatively important since, at a high concentration of Sb (30 mM ie 3,652.8 mg L⁻¹), they correspond to 78% and 71% of those recorded for the control, respectively. Therefore, this attests to an important adaptation of the strain to excessive levels of antimony. Such an adaptation also appears in the exceeding of both enzyme activities at 5 mM Sb compared to those of the control and the other Sb treatments.

The plant, *H. pallidum*, from which *A. tubingensis* was isolated, exhibited, on the contrary, an increase in the activities of both enzymes according to Sb increase in soil (Benhamdi

et al. 2014). This could be explained by the fact that peroxidases of *H. pallidum* differ from those of *A. tubingensis*.

Conclusion

The fungal endophyte *Aspergillus tubingensis* isolated, for the first time, from the roots of an antimony accumulator plant, *Hedysarum pallidum* Desf., showed a high resistance to antimony by growing up to 500 mM Sb in broth media.

This strain showed an important adaptation to Sb toxicity by the establishment of antioxidant biomolecules defense systems allowing the endophyte to fight the toxicity of the medium. It appears that proline, CAT and SOD interact to eliminate H₂O₂ and avoid lipid peroxidation, while POD and APX are not involved in such a mechanism.

Similarity in some antioxidant responses of *A. tubingensis* to Sb toxicity with those of the host plant suggests that the fungal strain would participate in the protection of *H. pallidum* in trapping at least part of the ROS.

These results indicate that *A. tubingensis* developed indigenous mechanisms to tolerate high Sb doses. Although this strain was originated from terrestrial environment, its resistance to Sb was demonstrated in a liquid medium. This suggests that this strain could be a potential agent for bioremediation of both soil and aquatic environments contaminated by antimony.

Acknowledgments We would like to thank the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria for the financial support and the head of INRA Montpellier (France) for allowing us to achieve some of this work within its premises.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest No potential conflict of interest or financial disclosure for all authors. All persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study.

References

Bacal CJO, Yu ET (2017) Cellulolytic activities of a novel *Fomitopsis* sp. and *Aspergillus tubingensis* isolated from Philippine mangroves. *Philipp J Sci* 146:403–410

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* 158:96–104. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-9917-7>

Bentellis A, Azzoug R, El Hadeif El Okki M, Rached O (2014) Trace elements pollution from an abandoned mine and factors affecting Antimony concentrations in the Dahimine Wadi Bank soils (Northeast Algeria). *Carpath J Earth Env* 9:95–106

Chakraborty S, Mukherjee A, Das TK (2012) Biochemical characterization of a lead-tolerant strain of *Aspergillus foetidus*: an implication of bioremediation of lead from liquid media. *Int Biodeterior Biodegradation* 84:134–142. <https://doi.org/10.1016/j.ibid.2012.05.031>

Chakraborty S, Mukherjee A, Khuda-Bukhsh AR, Das TK (2014) Cadmium-induced oxidative stress tolerance in cadmium resistant *Aspergillus foetidus*: its possible role in cadmium bioremediation. *Ecotox Environ Safe* 106:46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.007>

Chance B, Maehly AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol* 2:764–775. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>

Choi J, Détry N, Kim KT, Asiegbu FO, Valkonen JPT, Lee YH (2014) fPoxDB: fungal peroxidase database for comparative genomics. *BMC Microbiol* 14:117. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-117>

Clemente R (2013) Antimony. In: Alloway BJ (ed) Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability, 3rd edn. Springer, Dordrecht, pp 497–506

Demidchik V (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environ Exp Bot* 109:212–228. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>

Deng Z, Cao L, Huang H, Jiang X, Wang W, Shi Y, Zhang R (2011) Characterization of Cd and Pb-resistant fungal endophyte *Mucor* sp. CBRF59 isolated from rapes (*Brassica chinensis*) in metal contaminated soils. *J Hazard Mater* 185:717–724. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.078>

Devi KA, Pandey G, Rawat AKS, Sharma GD, Pandey P (2017) The endophytic symbiont—*Pseudomonas aeruginosa* stimulates the antioxidant activity and growth of *Achyranthes aspera* L. *Front Microbiol* 8:1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01897>

Feng R, Liao G, Guo J, Wang R, Xu Y, Ding Y, Mo L, Fan Z, Li N (2016) Responses of root growth and antioxidative systems of paddy rice exposed to antimony and selenium. *Environ Exp Bot* 122:29–38. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.08.007>

Huang HB, Feng XJ, Liu L, Chen Bin LYJ, Ma L, She Z-G, Lin YC (2010) Three dimeric Naphtho-γ-Pyrone from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* isolated from *Pongamia pinnata*. *Planta Med* 76:1888–1891

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275

Ma Y, Rajkumar M, Zhang C, Freitas H (2016) Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *J Environ Manag* 174:14–25. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.047>

Marklund S, Marklund G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47:469–474. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>

Mubarak H, Chai LY, Mirza N, Yang ZH, Pervez A, Tariq M, Shaheen S, Mahmood Q (2015) Antimony (Sb) - pollution and removal techniques—critical assessment of technologies. *Toxicol Environ Chem* 97:1–22. <https://doi.org/10.1080/02772248.2015.1095549>

Mukherjee A, Das D, Mondal SK, Biswas R, Das TK, Boujedaini N, Khuda-Bukhsh AR (2010) Tolerance of arsenate-induced stress in *Aspergillus niger*, a possible candidate for bioremediation. *Ecotox Environ Safe* 73:172–182. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.09.015>

Nakano Y, Asada K (1980) Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. *Plant Cell Physiol* 21:1295–1307. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076105>

Pierart A, Shahid M, Séjalon-Delmas N, Dumat C (2015) Antimony bioavailability: knowledge and research perspectives for sustainable agricultures. *J Hazard Mater* 289:219–234. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.011>

Qayyum S, Khan I, Maqbool F, Zhao Y, Gu Q, Peng C (2016) Isolation and characterization of heavy metal resistant fungal isolates from industrial soil in China. *Pak J Zool* 48:1241–1247

Raj S, Mohan S (2016) Impact on proline content of *Jatropha curcas* in fly ash amended soil with respect to heavy metals. *J Pharm Pharm* 8:244–247

Teng Y, Du X, Wang T, Mi C, Yu H, Zou L (2018) Isolation of a fungus *Penicillium* sp. with zinc tolerance and its mechanism

- of resistance. *Arch Microbiol* 200:159–169. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1430-x>
- Tsikis D (2017) Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges. *Anal Biochem* 524:13–30. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.021>
- Zhang L, Xiao S, Li W, Feng W, Li J, Wu Z, Gao X, Liu F, Shao M (2011) Overexpression of a Harpin-encoding gene *hrf1* in rice enhances drought tolerance. *J Exp Bot* 62:4229–4238. <https://doi.org/10.1093/jxb/err131>
- Zhou X, Sun C, Zhu P, Liu F (2018) Effects of antimony stress on photosynthesis and growth of *Acorus calamus*. *Front Plant Sci* 9:1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00579>
- Zouari M, Ben Ahmed C, Zorrig W, Elloumi N, Rabhi M, Delmail D, Ben Rouina B, Labrousse P, Ben Abdallah F (2016) Exogenous proline mediates alleviation of cadmium stress by promoting photosynthetic activity, water status and antioxidative enzymes activities of young date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Ecotox Environ Safe* 128:100–108. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.015>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

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

Filière : Biotechnologies
Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

Titre

Impact du plomb sur la réponse antioxydante d'*Aspergillus sp.*

Résumé

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence *in vitro* la capacité de l'endophyte fongique *Aspergillus sp.* à tolérer des teneurs élevées du plomb et d'évaluer le niveau du stress oxydatif et la défense antioxydante qui jouent un rôle important dans la réponse écotoxicologique des microorganismes dans des environnements pollués. La mise en culture d'*Aspergillus sp.* dans le bouillon Sabouraud contenant différentes concentrations en Pb (0 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 0.75, mM, 1 mM), a permis de déterminer l'effet toxicogène du Pb, la mesure des teneurs intracellulaires en peroxyde d'hydrogène et en proline ainsi que les activités antioxydantes à savoir le superoxyde dismutase et la catalase. Les résultats obtenus montrent que l'effet toxique du plomb sur ce mycoendophyte s'est traduit par une diminution de sa biomasse fongique, tout en gardant 44% de cette biomasse à la plus haute concentration (1mM Pb), ceci confirme sa tolérance aux fortes doses du plomb. Tandis que pour les systèmes de défenses antioxydantes, les résultats révèlent qu'*Aspergillus sp.* présente des activités enzymatiques importantes (le superoxyde dismutase 8.8624 U/mg de prot et la catalase 9.922 U/mg de prot) à 1 mM Pb, en neutralisant le peroxyde d'hydrogène. Les doses élevées en Pb ont généré l'accumulation du H₂O₂ où son taux maximal de 6.0163 mM/g de PF a été noté à 1 mM Pb, ceci a induit la stimulation de la synthèse de la proline atteignant une concentration de 9.9269 mM/g de PF en réponse au stress oxydatif, afin d'assurer la protection cellulaire contre les dommages causés par le H₂O₂. Ces résultats montrent qu'*Aspergillus sp.* a la capacité de réagir comme un agent de bioremédiation pour les sols pollués par le plomb.

Mot clés : Plomb, stress oxydatif, *Aspergillus sp.*, réponse antioxydante, bioremédiation.

Membre du jury :

Président :	LEGLIMI HIND	(MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).
Encadreur :	MEGHNOUS OUISSEM	(MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).
Examineur :	ABDELAZIZ OUIDED	(MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Présentée par :

BOUKHANFOUF AYA ANFAL

HANNECHE CHIRAZ

Année universitaire : 2022 -2023