

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

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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم: الميكروبيولوجيا

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

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Biotechnologie

**Spécialité :** Mycologie et Biotechnologie Fongique

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

**Impact du stress salin sur la réponse antioxydante du genre  
d'*Aspergillus* sp.**

---

**Présenté par :** BOUHENACHE KHAOULA

Le 19 /06/2022

BOULOUDNINE LAMIA

KOUADRA SARA

**Jury d'évaluation :**

**Encadreur :** BOULAHROUF Khaled (MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

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

**Examinatrice 2 :** ABDELAZIZ Ouidad (MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Année universitaire  
2021 - 2022**

# Remerciements

*On remercie en premier lieu notre Dieu qui nous a donné la force, la santé et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Nous tenons à saisir cette occasion et adresser nos profonds remerciements et notre profonde reconnaissance à notre encadrant **Mr. BOULAHROUF Khaled** Maitre conférence classe B au département de Microbiologie de l'Université Frères Mentouri de Constantine 1 pour l'orientation, la confiance, la patience, la disponibilité qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leur proposition.*

*Nous remercions à **Mme Meghnous Ouissem** Maitre Assistante classe B au département de Microbiologie de l'université Frères Mentouri de Constantine1 et à **Mme ABDELAZIZ Ouidad** Maitre conférence classe B au département de Microbiologie de l'Université Frères Mentouri de Constantine 1. C'est un réel plaisir pour nous que vous ayez participé au jury de ce mémoire.*

*Nos remerciements s'étendent également à **Mme Meghnous Ouissem** et **Mme Kassa-Laouar Mounia** pour leurs accueils, leurs précieux conseils et leurs aides durant toute la période du travail au laboratoire.*

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

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

## *Dédicaces*

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

*« À mes très chers parents, pour leurs aide, soutien moral et leur encouragement tout au long de mes années d'études, que Dieu les protège ».*

*À mes très chers frères :*

*Abderrahim pour son encouragement, son sacrifice et ses conseils qui m'ont permis d'aller jusqu'au bout.*

*Haroun Errachid pour son soutien moral et son amour.*

*À mes très chères belles sœurs : Ikram et Arij*

*Pour lesquels je souhaite une longue vie pleine de joie, de santé et de bonheur, que Dieu les garde.*

*À tous les enseignants qui ont contribué à ma formation.*

*À toute ma famille et à tous ceux qui m'ont soutenu dans mon cursus.*

*À mes Amies Lamia et Sara, pour leurs patiences et compréhension tout au long de ce travail. Q' Allah vous donnez beaucoup de santé du bonheur, du courage et surtout réussite.*

*À toutes mes amies sans exception.*

*À tous ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin.*

*À tous mes collègues de la promotion MBF (2022).*

**KHAOULA**

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail :*

*À mes très chers parents, source de mon bonheur.*

*Mon père **Abd El Aziz** et ma mère **Nekkeche Ouanassa** pour leurs amour, leurs sacrifices et tous les efforts qu'ils ont faits pour mon éducation, qui m'ont toujours aidé et guidé vers le chemin*

*De la réussite.*

*À mes chers sœurs **Asma, Amina, Dounia, Ritadje, Ahlem** et son marie **Mohamed Ghemari** pour leurs aide, leurs conseils et leurs*

*Encouragements.*

*À mon cher et unique frère **Kamel** pour leur support durant Tous mes parcours que j'ai suivis.*

*À ma famille et mes chers amis qui m'ont accordé leur soutien dans les instants les plus Difficiles.*

*À tous les enseignants qui ont contribué à ma formation.*

*Toutes personne qui de près ou de loin participé à ce travail.*

*À mes chers amies **Bouhenache Khaoula** et **Kouadra Sara** pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce travail. Puisse Allah vous donnez santé, bonheur, courage et surtout réussite.*

*LAMIA*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail*

*Aux deux êtres les plus chers au monde, qui ont*

*Souffert nuit et jour.*

*À Mes chers parents Source d'amour, d'espoir et d'encouragement pendant tous  
mes années d'étude, que Dieu*

*Les protège.*

*À Ma chère grand-mère qui ma comblée par ses conseils et ses prières.*

*À Mes très chères belles sœurs : Dalal, Warda, Imen, Radia et Dounia pour  
leurs encouragements permanents, et leur Soutien moral.*

*À Mes chers frères Hassen et AbdeNasser qui ont été toujours à mes côtés je  
puisse dieu vous donne la bonne santé, le bonheur et surtout la réussite.*

*À tous ceux qui me sont chers de ma famille.*

*À tous mes amies sans exception,*

*Merci beaucoup.*

*À mes adorables amies Khaoula et Lamia :*

*Pour leurs compréhensions, gentillesse et leurs patiences.*

*Pour tous les bons moments passés ensemble.*

*Pour avoir été toujours présentes à mes côtés quand j'en avais besoin.*

*À tous mes collègues de spécialité Mycologie*

*et biotechnologie fongique (2022)*

**SARA**

## Liste des abréviations

**4-HNE** : 4-hydroxynonéal

**AGPI** : Acides gras poly-insaturés

**Arg** : Arginine

**BSA** : *Bovine sérum albumine*

**C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KNaO<sub>6</sub>** : Tartrate de sodium et de potassium

**C<sub>5</sub>** : Atome de carbone numéro 5

**C<sub>6</sub>** : Atome de carbone numéro 6

**C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>** : Citrate de sodium

**CAT** : Catalase

**CuZn-SOD** : Superoxyde dimutase à cuivre et zinc

**Cu<sup>2+</sup>** : Ion cuivre

**CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O** : Sulfate de cuivre pentahydraté

**Cys** : Cystéine

**e<sup>-</sup>** : Électron

**ERO** : Espèces réactives d'oxygènes

**Fe-SOD** : Superoxyde dimutase à fer

**Fe<sup>2+</sup>** : Ion ferreux

**Fe<sup>3+</sup>** : Ion ferrique

**GPX** : Glutathion peroxydase

**GSH** : Glutathion réduit

**GSH-PX** : Glutathion peroxydase

**GSSG** : Glutathion oxydé

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène

**His** : Histidine

**ISR** : *Induced Systemic Resistance*

**K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** : Phosphate dipotassique (Hydrogénophosphate de potassium)

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : Phosphate monopotassique (Dihydrogénophosphate de potassium)

**KI** : L'iodure de potassium

**LDL** : *Low density lipoproteins*

**LPO** : *Lipid Peroxidation*

**Lys** : Lysine

**MDA** : Malondialdéhyde

**Met** : Méthionine

**Mn- SOD** : Superoxyde dismutase à Manganese

**Na<sup>+</sup> Cl<sup>-</sup>** : Ions chlorure de sodium

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Sodium carbonate

**Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> · 2H<sub>2</sub>O** : *Tri-Sodium citrate dihydrate*

**NaCl** : Le chlorure de sodium

**NaOH** : L'hydroxyde de sodium

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** : L'ion superoxyde

**OH<sup>•</sup>** : Radical hydroxyle

**PDA** : *Potato Dextrose Agar*

**pH** : Potentiel hydrogène

**Pro** : Proline

**PTP** : Pore de transition de perméabilité

**PVP** : Polyvinylpyrrolidone

**ROS** : *Reactive oxygen species*

**Se** : Sélénium

**SOD** : Superoxyde dismutase

**TCA** : Acide trichloroacétique

**Thr** : Thyrosine

**Trp** : Tryptophane

**YPD** : *Yeast Extract–Peptone–Dextrose*

## Liste des Figures

<b>Figure 1</b> : photo représente les sols affectés par le sel. ....	2
<b>Figure 2</b> : schématisation de la balance entre les ERO et les antioxydants (Biteur, 2012). ....	6
<b>Figure 3</b> : schéma des différentes formes d'ROS (Garait, 2006). ....	7
<b>Figure 4</b> : répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule (Garait, 2006). .	10
<b>Figure 5</b> : photo qui représente l'interaction plantes / champignons endophytes. ....	15
<b>Figure 6</b> : étapes de la culture solide. ....	20
<b>Figure 7</b> : étapes de la culture submergée. ....	21
<b>Figure 8</b> : filtration et récupération de la biomasse. ....	21
<b>Figure 9</b> : broyage et centrifugation de l'extrait enzymatique. ....	22
<b>Figure 10</b> : aspect des colonies d' <i>Aspergillus</i> sp. après 5 jours. ....	24
<b>Figure 11</b> : aspect microscopique d' <i>Aspergillus</i> sp. au grossissement x40. ....	25
<b>Figure 12</b> : représente les diamètres de la croissance d' <i>Aspergillus</i> sp. pendant les trois premiers jours sur le milieu YPD supplémenté par des différentes concentrations de NaCl...	26
<b>Figure 13</b> : poids de biomasse d' <i>Aspergillus</i> sp. Après 96h d'incubation sur le bouillon YPD tamponné et non tamponné supplémenté par des différentes concentrations de NaCl. ....	27
<b>Figure 14</b> : teneur intracellulaire en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> d' <i>Aspergillus</i> sp. sur le bouillon YPD tamponné et non tamponné supplémenté par des différentes concentrations de NaCl. ....	28
<b>Figure 15</b> : activités de la CAT d' <i>Aspergillus</i> sp. sur le bouillon YPD tamponné et non tamponné supplémenté par différentes concentrations de NaCl. ....	29
<b>Figure 16</b> : quantité des protéines d' <i>Aspergillus</i> sp. sur le bouillon YPD tamponné et non tamponné supplémenté par différentes concentrations de NaCl. ....	30

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> caractères macroscopiques des colonies d' <i>Aspergillus</i> sp. ....	24
<b>Tableau 2:</b> caractères microscopiques des colonies d' <i>Aspergillus</i> sp. ....	25
<b>Tableau 3:</b> variations du pH du bouillon YPD tamponné et non tamponné en présence de différentes concentrations de NaCl après la croissance fongique. ....	27

## Résumé

Au cours de ces dernières années, la pollution des sols par la salinité est l'un des problèmes environnementaux le plus dangereux qui affectent en grande mesure la production végétale et la flore microbienne dans le monde. Les champignons endophytes associées aux plantes ont été reconnus comme l'un des facteurs clés pour aider les plantes hôtes à résister le stress salin. L'objectif de cette étude est d'analyser et d'expliquer la capacité antioxydante d'*Aspergillus* sp. sous l'effet des différentes concentrations de NaCl (0%,5%,10%,15% et 20%), réalisé par une culture solide et liquide qui permet de déterminer la croissance, la biomasse fongique et la mesure des activités antioxydantes d'*Aspergillus* sp. Nos résultats montrent que cette souche a une bonne croissance et production de biomasse jusqu'à 15% de NaCl environ de 1430 mg, cela confirme sa grande tolérance au sel. Nous avons confirmé qu'*Aspergillus* sp. à une activité de catalase efficace de 4.23  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  à 15% de NaCl qui est permet de détoxifier le peroxyde d'hydrogène à un taux maximale de 10% qui correspond à 0,39  $\text{mM g}^{-1}$ , ce qui explique l'augmentation de la production des protéines en 15% à une valeur de 442.95  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ces derniers assurent la protection des cellules contre les dommages causés par  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ces résultats suggèrent qu'*Aspergillus* sp. capable de tolérer le stress oxydatif en développant des mécanismes de défense antioxydante, ce qui, confère à cette souche la capacité d'être exploitée pour l'élimination de la salinité des environnements contaminés.

**Mots clés :** champignons endophyte, stress salin, réponse antioxydante, *Aspergillus* sp., catalase, stress oxydatif, peroxyde d'hydrogène.

## **Abstract**

In recent years, salinity pollution of soils is one of the most dangerous environmental problems that greatly affects plant production and microbial flora in the world. Plant-associated endophytic fungi have been recognized as one of the key factors to help host plants resist salt stress. The objective of this study is to analyze and explain the antioxidant capacity of *Aspergillus* sp. under the effect of different concentrations of NaCl (0%, 5%, 10%, 15% and 20%), carried out by a solid and liquid culture that allows to determine the growth, fungal biomass and measurement of antioxidant activities of *Aspergillus* sp. Our results show that this strain has a good growth and biomass production up to 15% of NaCl about 1430 mg, this confirms its high tolerance to salt. We confirmed that *Aspergillus* sp. has an efficient catalase activity of 4.23  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  at 15% NaCl which is able to detoxify hydrogen peroxide at a maximum rate of 10% which corresponds to 0.39  $\text{mM g}^{-1}$ , which explains the increase in protein production at 15% to a value of 442.95  $\mu\text{g}$ . The latter ensure the protection of cells against the damages caused by  $\text{H}_2\text{O}_2$ . These results suggest that *Aspergillus* sp. is able to tolerate oxidative stress by developing antioxidant defense mechanisms, which confers to this strain the capacity to be exploited for the elimination of salinity from contaminated environments.

**Key words :** endophytic fungi, salt stress, antioxidant response, *Aspergillus* sp., catalase, oxidative stress, hydrogen peroxide.

## ملخص

في السنوات الأخيرة يعد تلوث التربة بالملوحة من أخطر المشاكل البيئية التي تؤثر الى حد كبير على الانتاج النباتي والنبات الميكروبية في العالم. تم التعرف على الفطريات الداخلية المرتبطة بالنباتات كأحد العوامل الرئيسية في مساعدة النباتات المضيئة على مقاومة الاجهاد الملحي. الهدف من هذه الدراسة هو تحليل وشرح السعة المضادة للأكسدة لـ *Aspergillus* sp. تحت تأثير تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم (0%، 5%، 10%، 15%، 20%)، بواسطة زراعة صلبة وسائلية. التي تسمح بتحديد النمو والكتلة الحيوية الفطرية وقياس الأنشطة المضادة للأكسدة. *Aspergillus* sp تظهر نتائجنا أن الاجهاد الملحي له تأثير سام على *Aspergillus* sp. على الرغم أن هذه السلالة نفسها لها نمو وانتاج الكتلة الحيوية يصل الى 15% من كلوريد الصوديوم وهذا يؤكد تحملها العالي للملح. لقد حصلنا على ان هذا الفطر الداخلي له نشاط كتالاز فعال يقدر ب 4.23 ميكرو مول / الدقيقة عند 15% من كلوريد الصوديوم. والذي يستخدم لإزالة سموم بيروكسيد الهيدروجين بمعدل أقصى قدره 10% وهو ما يعادل 0.39 ملي مولار / غرام، وهو ما يفسر الزيادة في انتاج البروتين عند 15% بنسبة 442.95 ميكرو غرام /ميلي لتر وهذا الأخير يضمن حماية الخلايا من التلف الذي يسببه بيروكسيد الهيدروجين. تشير هاته النتائج الى ان *Aspergillus* sp. قادر على تحمل الإجهاد التأكسدي من خلال تطوير آليات دفاع مضادة للأكسدة مما يمنح هذه السلالة القدرة على استغلالها لإزالة الملوحة من البيئات الملوثة.

**الكلمات المفتاحية:** فطريات داخلية، الإجهاد الملحي، الاستجابة المضادة للأكسدة، *Aspergillus* sp.، كتالاز، الاجهاد التأكسدي، بيروكسيد الهيدروجين.

## Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des Figures

Liste des tableaux

Résumés

**Introduction** ..... 1

### 1. Revue bibliographique

#### Chapitre 1 : Le stress salin dans l'environnement

1. Pollution	2
1.1 Contamination du sol par le sel	2
1.2 Effet de la salinité sur la croissance et le développement des plantes	3
1.3 Impact de stress salin sur la flore microbienne	3
2. Stress	3
2.1 Définition	3
2.2 Types de stress abiotiques dans le sol	4
2.2.1 Stress thermique	4
2.2.2 Stress hydrique	4
2.2.3 Stress salin	4
2.2.3.1 Stress ionique	5
2.2.3.2 Stress osmotique	5
3. Toxicité ionique Na <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup>	5
4. Stress oxydatif et radicaux libres dans la biologie	5
4.1 Stress oxydatif	5
4.2 Radicaux libres	6
4.2.1 Espèces réactives d'oxygènes (ERO)	6
4.2.2 Types des espèces réactives d'oxygènes (ERO)	7
4.2.2.1 Anion superoxyde	7
4.2.2.2 Radical hydroxyle	7
4.2.2.3 Peroxyde d'hydrogène	8
5. Conséquences du stress oxydatif	8
5.1 Peroxydation lipidique	8
5.2 Oxydation des protéines	9
5.3 Dommages de l'ADN	9

## Chapitre 2 : Les antioxydants microbiens

1. Définition .....	10
2. Mécanisme d'action des antioxydants.....	10
3. <i>Aspergillus</i> source des antioxydants .....	11
4. Systèmes antioxydants enzymatiques .....	11
4.1 Superoxyde dismutase (SOD) .....	11
4.2 Catalases (CAT) .....	12
4.3 Glutathion peroxydase (GPX) .....	12
5. Systèmes antioxydants non enzymatiques .....	12
5.1 Glutathion réduit (GSH) .....	12
5.2 Vitamine E.....	13
5.3 Vitamine C.....	13
5.4 Proline.....	13

## Chapitre 3 : Les champignons endophytes

1. Endophyte : Origine, évolution et définition.....	14
2. Biologie et diversité écologique des champignons endophytes .....	14
2.1 Nature de l'interaction plante/champignons endophytes.....	15
3. Rôle des endophytes dans la tolérance aux stress abiotique .....	16
4. <i>Aspergillus</i> .....	16
4.1 Généralités .....	16
4.2 Classification .....	17
5. Mécanismes de résistance ou tolérance d' <i>Aspergillus</i> sp. au stress salin .....	17

## 2. Matériel et méthodes

1. Objectif :.....	19
2. Matériel biologique .....	19
3. Réactivation de la souche.....	19
4. Identification .....	19
4.1 Identification macroscopique .....	19
4.2 Identification microscopique .....	19
5. Culture et suivie de la croissance des souches fongiques sous stress salin.....	20
5.1 Culture solide .....	20
5.2 Culture submergée.....	20
6. Préparation de la biomasse fongique.....	21
7. Mesure de la teneur intracellulaire de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	21

8. Mesure de l'activité enzymatique .....	22
8.1 Préparation de l'extrait enzymatique .....	22
8.2 Dosage de la catalase (CAT) .....	22
8.3 Dosage des protéines totales.....	23

### **3. Résultats et discussion**

1. Identification de l'isolat fongique .....	24
1.1 Caractères cultureux d' <i>Aspergillus sp.</i> .....	24
1.1.1 Caractères macroscopiques .....	24
1.1.2 Caractères microscopiques.....	25
2. Etude de la tolérance d' <i>Aspergillus sp.</i> à la salinité.....	25
2.1. Effet de NaCl sur la croissance d' <i>Aspergillus sp.</i> sur milieu solide.....	25
2.2 Effet de NaCl sur la croissance d' <i>Aspergillus sp.</i> sur milieu liquide .....	26
2.3 Effet de NaCl sur le pH du milieu de culture .....	27
3. Effet de NaCl sur activités enzymatiques antioxydantes .....	28
3.1 Peroxyde d'hydrogène(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	28
3.2 Catalase (CAT) .....	29
3.3 Protéines totales.....	29

### **4. Conclusion et perspectives**

### **5. Références bibliographiques**

### **6. Annexes**

# **Introduction**

De nos jours, la pollution représente l'un des problèmes majeurs due à une altération environnementale par l'ensemble des rejets de composés toxiques libérés dans l'écosphère, et qui entraînent une influence perturbatrice sur l'environnement (Semlali *et al.*, 2001).

Le stress salin est considéré comme l'un des polluants abiotiques les plus importants affectant la fertilité des sols agricoles et limitant la croissance et la productivité des plantes dans le monde (Hosseyini moghaddam *et al.*, 2021).

La salinité du sol représente un facteur de stress réduisant la diversité des microbes en affectant leurs fonctions et leurs activités (Moradi *et al.*, 2011). Récemment les communautés microbiennes associées aux plantes ont été reconnues comme l'un des facteurs clés pour aider les plantes hôtes à résister aux stress abiotiques. Diverses études ont confirmé que les endophytes fongiques sont parmi les symbiotes bénéfiques qui confèrent des avantages adaptatifs aux plantes hôtes sous l'effet des stress environnementaux, tels que la sécheresse, la chaleur et la salinité (Hosseyini moghaddam *et al.*, 2021).

La salinité produit un stress oxydatif qui provoque l'accumulation des radicaux libres dans les tissus végétaux qui induisent de graves problèmes de la santé publique en raison de leur toxicité (Kattab, 2007).

Actuellement les champignons endophytes représentent une nouvelle source d'antioxydants puissants (Sharma *et al.*, 2019). En particulier le genre *Aspergillus* sp. qui est capable d'éliminer les ROS et de réduire l'effet délétère du stress salin sur les plantes hôtes et peut être utiliser comme biofertilisant pour soutenir l'agriculture dans des conditions du stress biotique et abiotique (Ali *et al.*, 2021).

La neutralisation des radicaux libres induit par le stress oxydatif est effectuée par le développement d'une série de mécanismes de défenses antioxydants enzymatiques qui comprennent la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (CAT), tandis que les antioxydants non enzymatiques sont représentés par la vitamine C, la vitamine E et le glutathion réduit (GSH)...etc. Dans les conditions normales, il existe un équilibre entre les pro-oxydants (ROS) et les antioxydants qui sont essentiel à la survie et la santé des organismes (Valko *et al.*, 2007).

Pour tous les problèmes cités nous nous sommes fixés l'objectif suivant :

L'objectif de notre travail est de mettre en évidence l'activité antioxydante (catalase) d'*Aspergillus* sp. en réponse au stress salin.

# **Revue bibliographique**

## 1. pollution

La pollution est une altération de l'environnement sous l'effet de la diffusion des produits toxiques dans l'écosphère, et qui entraînent une influence perturbatrice sur l'environnement. Cependant, un accroissement important de la pollution de l'air, des eaux et des sols est provoqué par le développement des activités industrielles (Biteur, 2012).

Généralement, la plupart des pollutions sont à l'origine des activités humaines entraînent une dégradation de la qualité de l'environnement.

La pollution est l'un des problèmes majeurs présent depuis longtemps ; provoquant des risques de la morbidité et de la mortalité des êtres vivants (Chowdhary *et al.*, 2020).

### 1.1 Contamination du sol par le sel

De nos jours, la pollution du sol par le sel (**Figure 1**), représente un grand problème dans le monde. Actuellement la salinité est l'un des facteurs qui affectent en grande mesure la fertilité et la productivité des sols, en diminuant le rendement des cultures, en particulier dans les zones méditerranéennes ou bien dans celles où les cultures dépendent de l'irrigation (Middleton et Thomoa., 1992).



**Figure 1** : photo représente les sols affectés par le sel.  
(<https://images.app.goo.gl/BPt4ZRTYSDqRvoXT7>)

## 1.2 Effet de la salinité sur la croissance et le développement des plantes

Parmi les facteurs abiotiques la salinité et la sécheresse provoquent une menace sur les propriétés pédologiques notamment la dispersion des colloïdes et la stabilité structurale. Le stress salin et la sécheresse limitent le développement des plantes par la diminution de potentiel hydrique ce qui induit un déséquilibre ionique conduisant à une toxicité osmotique et ionique et en conséquence, cette limitation est liée à un faible potentiel osmotique et un déséquilibre nutritionnel, également des effets d'ions spécifiques ou une combinaison de tous ces facteurs. L'impact négatif est remarqué chez toutes les plantes, mais leurs capacités de réduction de la croissance et la tolérance varient largement entre les différentes espèces (Nehela, 2016).

## 1.3 Impact de stress salin sur la flore microbienne

Le stress salin représente l'un des problèmes sérieux pour toutes les cellules vivantes à cause de fortes concentrations externes en sel, cette dernière affecte la perméabilité des membranes provoquant ainsi une perte d'eau. L'augmentation continue des teneurs en sel se terminera par la mort des Cellules.

Dans le sol un stress salin a un effet néfaste sur l'activité microbienne qui a des actions complexes et imprévisibles du fait des interactions possibles entre les ions, les bactéries, les champignons et les particules du sol. Généralement, les taux élevés de salinité inhibent la croissance de nombreux microorganismes du sol. Il existe une corrélation négative entre le nombre de la flore microbienne et la concentration des sels solubles. La salinité du sol réduit la diversité des microbes en affectant leurs fonctions et leurs activités, l'NaCl inhibe considérablement la croissance des populations fongiques, bactériennes diminuent significativement en présence de 5% de NaCl. Donc la synthèse des enzymes, des ribosomes, des protéines et également celle des antibiotiques est inhibée en présence de concentrations élevées de sel (Ameur, 2014).

## 2. Stress

### 2.1 Définition

Le terme stress signifie toute pression dominante exercée par un paramètre, perturbant le fonctionnement habituel de la plante.

On appelle stress l'ensemble des conditions qui provoquent des changements des processus physiologiques induisant éventuellement en dégâts, blessures, dommages, inhibition de la croissance ou de développement. Le stress est principalement un concept mécanique défini par les ingénieurs et les physiciens comme étant une force exercée par unité de surface

d'un objet en réponse au stress, l'objet oppose une déformation ou un changement de dimensions (Hopkins, 2003).

Certains physiologistes qui étudient le stress supposent que ce concept est trop restrictif, parce qu'il suscite des questions sur les mécanismes adaptatifs qui assurent la croissance de plantes dans des environnements qui pourraient être considérés comme stressants d'autre part, la réponse des végétaux dépend, entre autres, de ces paramètres environnementaux, (le type de contrainte, son intensité et sa durée) et génétiques (espèce et génotype) (Hopkins, 2003).

## **2.2 Types de stress abiotiques dans le sol**

Parmi les facteurs non vivants, le stress abiotique a un effet nuisible sur les organismes vivants dans un entourage spécifique créé soit naturellement ou par des actions humaines, il affecte négativement la performance et la physiologie des individus (Nehela, 2016).

Il est dû essentiellement à des facteurs environnementaux comme la sécheresse, les températures extrêmes, excès d'eau et la salinité (Hopkins, 2003).

### **2.2.1 Stress thermique**

On définit le stress thermique lorsque les températures sont augmentées dans un temps suffisant ses dernières causent des dégâts de manière irréversible sur la fonction et la croissance des plantes (Oukarroum, 2007).

### **2.2.2 Stress hydrique**

Il est provoqué par un manque en eau créant une menace permanente pour la survie des plantes, néanmoins, beaucoup d'entre elles induisent des modifications morphologiques et physiologiques qui leurs permettent de survivre dans les régions de faible pluviosité dont la teneur en eau des sols est peu élevée. D'autre part, des concentrations salines élevées génèrent de bas potentiels hydriques du sol, ce dernier induite la sécheresse physiologique (Hopkins, 2003).

### **2.2.3 Stress salin**

Le stress salin est défini comme une concentration excessive en sel. Le terme stress salin s'applique surtout à un excès des ions, en particulier  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  (Hopkins, 2003). La salinité des sols c'est l'un des principaux stress abiotiques limitant la croissance des plantes cultivées. Cette salinité peut provoquer naturellement ou par les activités agricoles comme l'irrigation ou l'utilisation de certains types d'engrais (Jabnoute, 2008).

### 2.2.3.1 Stress ionique

Il est l'un des facteurs endommages provoqué des effets toxiques par des fortes concentrations d'ions spécialement  $\text{Na}^+\text{Cl}^-$ . L'excès salin ( $\text{Na}^+\text{Cl}^-$ ) peut causer des problèmes de membranes, des inhibitions enzymatiques ou un dysfonctionnement métabolique chez les plants (Hopkins, 2003).

### 2.2.3.2 Stress osmotique

Le stress osmotique est défini comme une diminution ou une augmentation de l'osmolarité de l'environnement (Boublenaza, 2013). Selon Song *et al.* (2005), plus la salinité de solution du sol augmenté, plus la pression osmotique est élevée et plus il est difficile pour les racines d'extraire l'eau de la réserve du sol, qui provoque ainsi un ralentissement de leur croissance.

## 3. Toxicité ionique $\text{Na}^+ \text{Cl}^-$

Le sel joue un rôle important dans la dégradation des sols. Néanmoins, des concentrations excessives d'ions chlorure et sodium dans la solution du sol peuvent être un facteur limitant à la croissance et au développement des plantes.

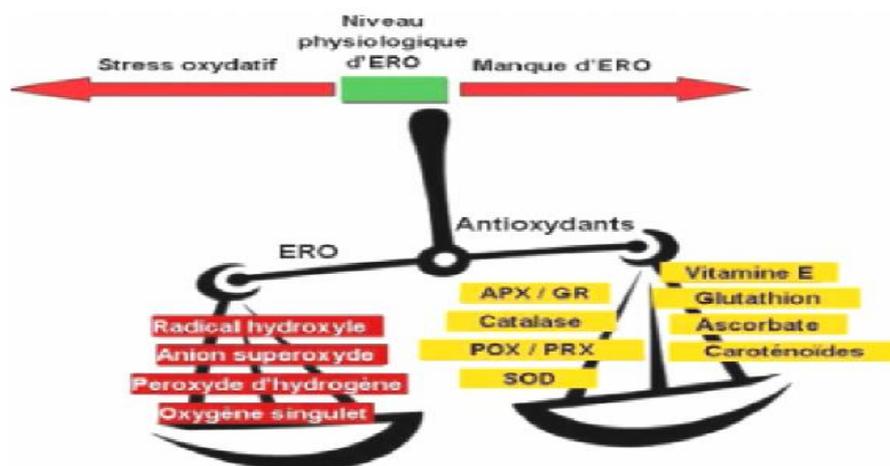
Les conséquences de la salinité ne cessent de prendre de l'ampleur, se manifestent par la toxicité directe due à l'accumulation excessive des ions ( $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ ) dans les tissus des organes, et à un déséquilibre nutritionnel responsable principalement à des compétitions entre les éléments minéraux, tel que le sodium avec le potassium et le calcium, le chlorure avec le nitrate, le phosphate et le sulfate (Chérifi *et al.*, 2017).

## 4. Stress oxydatif et radicaux libres dans la biologie

### 4.1 Stress oxydatif

En 1991, le stress oxydant a été défini par Sies comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des ROS, suite à un déséquilibre dû, soit à une production accrue d'ROS, ou à une diminution de la capacité de défenses des antioxydants (Bouguerne, 2012).

Le stress oxydatif est le résultat de la réaction métabolique qui utilise l'oxygène et induit une perturbation de l'équilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants (**Figure2**) dans les organismes vivants (Valko *et al.*, 2007).



**Figure 2:** schématisation de la balance entre les ERO et les antioxydants (Biteur, 2012).

## 4.2 Radicaux libres

La notion d'un radical libre est définie comme une espèce chimique, atome ou molécule, contient un électron libre instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour s'apparier de son électron. Soit Il peut gagner un électron (se comportant comme un oxydant), soit en cédant un électron (agissant alors comme un réducteur). Cette première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux ; Alors que la production d'un premier radical libre peut provoquer plusieurs lésions dans une cellule (Garait, 2006).

### 4.2.1 Espèces réactives d'oxygènes (ERO)

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

La notion ROS signifié les radicaux libres de l'oxygène : **radicalaires** tel que le radical superoxyde ( $O_2\bullet^-$ ), radical hydroxyle ( $OH\bullet$ ) mais aussi existe certains dérivés oxygénés **non radicalaires** dont la toxicité est importante comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (**Figure3**) (Garait, 2006).

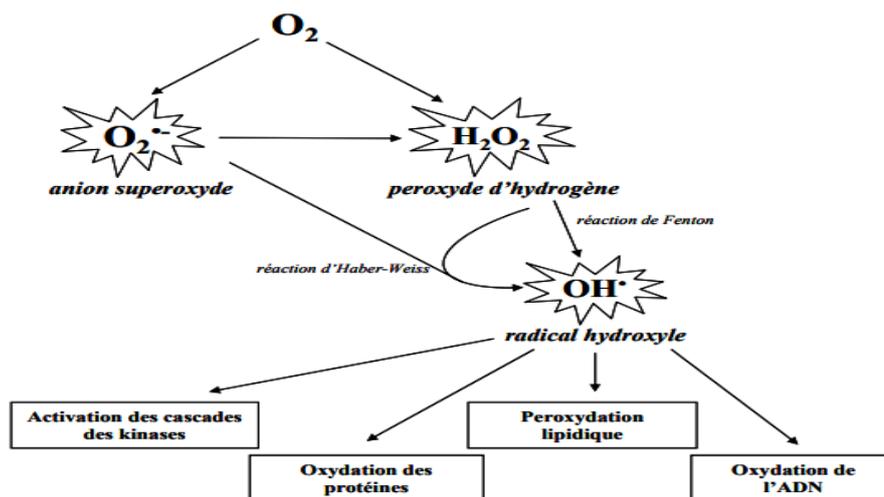


Figure 3 : schéma des différentes formes d'ROS (Garait, 2006).

## 4.2.2 Les types des espèces réactives d'oxygènes (ERO)

### 4.2.2.1 Anion superoxyde

Au cours de divers processus physiologiques dans l'organisme, un électron peut être transféré au dioxygène, ce qui permet la formation de radical superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ )

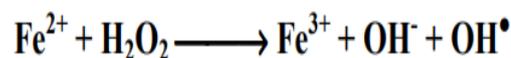


Sa réactivité est particulière à certains acides aminés et les lipides tel que le tryptophane, l'histidine, la méthionine, qui permettent la formation des hydroperoxydes, l'anion superoxyde a une demi-vie courte, d'environ 2 à 4 microsecondes, ce dernier est incapable de diffuser dans la cellule (Biteur, 2012).

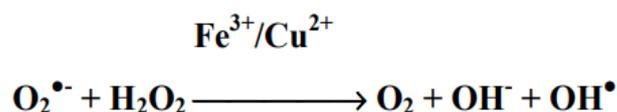
### 4.2.2.2 Radical hydroxyle

Le radical hydroxyle ( $OH^\bullet$ ), est la forme neutre de l'ion hydroxyde  $OH^-$ . Le radical hydroxyle a une forte réactivité, ce qui en fait le radical le plus dangereux (Valko, 2007).

Ce radical est formé essentiellement par la dégradation du  $H_2O_2$  seul, et  $H_2O_2$  lié à du fer ferreux conduit à la réaction de fenton :



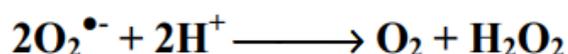
$H_2O_2$  peut aussi réagir avec le radical superoxyde, aboutissant à la formation d' $OH^\bullet$ . Ce mécanisme est appelé la réaction de Haber et Weiss qui es la suivante :



Parmi les espèces dérivées de l'oxygène, le radical hydroxyle est le plus réactif il réagit fortement et très rapidement avec toutes les molécules biologiques se trouvant dans son voisinage (protéine, lipide, ADN) entraînant ainsi plusieurs dommages. Il est l'espèce réactive majeure responsable de la cytotoxicité des radicaux libres (Biteur, 2012).

#### 4.2.2.3 Peroxyde d'hydrogène

La formation de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se fait par la dismutation spontanée ou enzymatique du radical superoxyde, la dismutation enzymatique est principalement catalysée par le superoxyde dismutase (SOD)



Il existe d'autres enzymes que SOD produisant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tel que les oxydases présentent surtout dans les peroxyosomes. Cependant, certaines de ces oxydases comme la D-amino acide oxydase peuvent catalyser directement la réduction divalente de l'oxygène moléculaire, formant aussi le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sans production du radical superoxyde (Biteur, 2012).

## 5. Conséquences du stress oxydatif

Les principaux dégâts cellulaires induits par les ROS sont : **la peroxydation des lipides, l'oxydation des protéines**, et aussi **la modification de l'ADN**. Ces altérations peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose (mort cellulaire programmée). Les ROS initient également l'apoptose en activant l'ouverture du port de transition de perméabilité (PTP) (Garait, 2006).

### 5.1 Peroxydation lipidique

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

L'oxydation des lipides produit des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation de lipides provoque un changement de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes.

Par conséquent, ce phénomène fournit une variété de produits, dont Certains peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés lors de la Peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE) qui ont été largement étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (Garait, 2006).

## 5.2 Oxydation des protéines

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

L'oxydation de quelques acides aminés des protéines (en particulier Arg, His, Lys, Pro, Thr et Trp) forme des groupes carbonyles libres qui peuvent inhiber ou modifier l'activation de la protéine et augmenter la susceptibilité à l'attaque protéolytique (Møller *et al.*, 2007).

## 5.3 Dommage de l'ADN

Le stress oxydant est d'origine mitochondriale, ces organites sont parmi les cibles des ROS. En effet, le stress oxydant susceptible au génome mitochondrial qui est 10 fois plus à celle du génome nucléaire (Garait, 2006).

Les dommages d'ADN impliquent d'abord de traverser toutes les barrières de défense mise en place par les végétaux, la capacité de détoxification des cellules ou de l'organisme liée au potentiel du système de réparation de l'ADN. Divers effets peuvent alors être : (Biteur, 2012).

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

Les attaques au niveau des bases sont différentes. Par exemple, les radicaux hydroxyles attaquent la double liaison de la thymine en C<sub>5</sub> ou C<sub>6</sub> et éliminent rarement l'hydrogène du groupe méthyle. Le radical 6-hydroxythymine formé interagit avec O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> pour donner la thymine glycol, une base modifiée peut bloquer la réplication (Biteur, 2012).

## 1. Définition

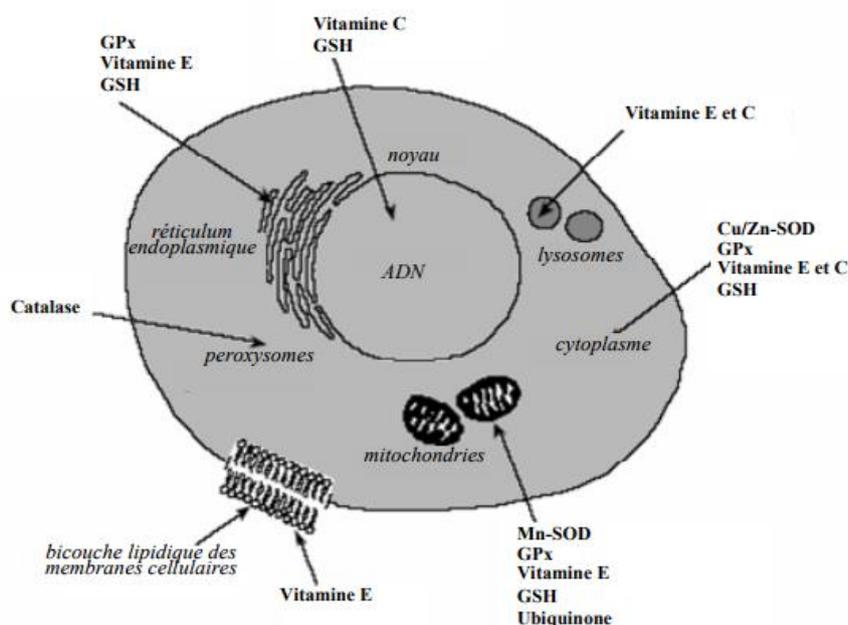
Une molécule antioxydant peut être définie comme toute substance capable d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables, et par conséquent retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats même à une concentration relativement faible (Bahi, 2015).

## 2. Mécanisme d'action des antioxydants

Les microorganismes développent une série de mécanismes de défense contre les radicaux libres induit par stress oxydatif impliquent des mécanismes préventifs, de réparation, et aussi des mécanismes de défenses antioxydants (**Figure 4**) (Valko *et al.*, 2007).

Les systèmes d'antioxydants permettant le maintien d'un niveau non cytotoxique des EOR. Les cellules possèdent plusieurs systèmes antioxydants et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives d'oxygène.

La nature des systèmes antioxydants variée selon les tissus et aussi les types cellulaires, et selon le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Dans notre organisme existe deux types de défenses antioxydants : **enzymatiques** et **non enzymatiques** (Bahi, 2015).



**Figure 4:** répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule (Garait, 2006).

### 3. *Aspergillus* source des antioxydants

Généralement les antioxydants sont produits à partir des plantes médicinales, des fruits et des légumes, mais actuellement les champignons endophytes représentent une nouvelle source d'antioxydants puissants (Sharma *et al.*, 2019).

Le genre *Aspergillus* sp. a la capacité antioxydante, il permet de faciliter la production et la purification des antioxydants naturels. L'étude a démontré que le potentiel des champignons du sol ont une activité antioxydante similaire à celle des plantes supérieures (Arora et Chandra, 2010). Certains champignons ont été isolés du sol et analysés pour leurs activités antioxydantes, et l'un des meilleurs isolats du sol est de genre *Aspergillus* sp. (Arora et Chandra, 2011).

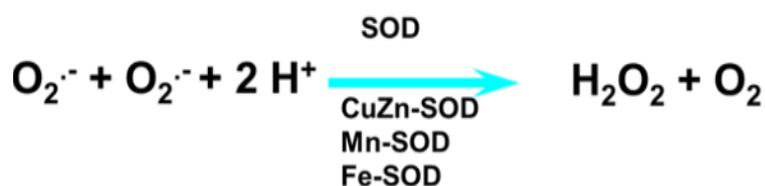
### 4. Systèmes antioxydants enzymatiques

Le superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase sont des antioxydants enzymatiques qui représentent la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS (Garait, 2006).

#### 4.1 Superoxyde dismutase (SOD)

La superoxyde dismutase ou SOD est une métallo-enzyme se retrouvant dans tous les organismes aérobies (Arora *et al.*, 2002). La défense contre le stress oxydatif biotique et abiotique est majoritairement réalisée par l'enzyme antioxydante SOD, qui catalyse la dismutation de deux anions superoxydes en dioxygène et peroxyde d'hydrogène (Benhamedi, 2014).

Selon Mesnoua (2016) :



Selon le cofacteur métallique, trois types de SOD sont généralement connus Cu/Zn – SOD, Mn-SOD et Fe-SOD elles sont situées dans différents compartiments cellulaires. Les Cu/Zn – SOD dans le chloroplaste et le cytosol (Benhamdi, 2014).

## 4.2 Catalases (CAT)

Les catalases sont des enzymes majoritairement peroxysomales jouent un rôle principal dans la dismutation du peroxyde d'hydrogène. Elles agissent en synergie avec la SOD parce que cette dernière accélère la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire, selon la réaction suivante (Mesnoua, 2016).



## 4.3 Glutathion peroxydase (GPX)

Les enzymes de cette famille sont Sélénium (Se)-dépendante. La glutathion peroxydase (GPX) est situé dans le cytoplasme où elle est le responsable de la régulation de l'état redox physiologique intracellulaire des cellules vasculaires. Elle catalyse la réduction des hydroperoxydes ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), et des peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène (Bouguerne, 2012).



## 5. Systèmes antioxydants non enzymatiques

La plupart de composants antioxydants non enzymatiques ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Contrairement aux antioxydants enzymatiques. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons, la glutathion réduit (GSH), les vitamines E et C et l'acide aminé la proline (Garait, 2006).

### 5.1 Glutathion réduit (GSH)

Le glutathion réduit (GSH), permet la réduction de peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par le glutathion peroxydase (GSH-Px). Il est capable aussi de réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, et diminuent également les niveaux de peroxydation lipidique. **Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG)** est beaucoup plus utilisé comme un marqueur du stress oxydant puisque plus le flux d' $\text{H}_2\text{O}_2$  est élevé, plus que le glutathion réduit est consommé, et le glutathion oxydé augmenté (Bahi, 2015).

## 5.2 Vitamine E

La notion de la vitamine E utilisée pour toutes les molécules possédant des activités biologiques identiques à celles de la famille des tocophérols. La structure naturelle de la vitamine E possède quatre tocophérols isomères  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , avec une activité antioxydante différente. L' $\alpha$ -tocophérol est le principal antioxydant de la famille des tocophérols. Sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile et une extrémité hydrophobe. Au cours de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' $\alpha$ -tocophérol, joue le rôle d'un inhibiteur de la propagation de la peroxydation lipidique, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical  $RO_2$  (Bahi, 2015).

## 5.3 Vitamine C

La vitamine C est appelée aussi l'acide ascorbique, n'est pas synthétisée par l'organisme (Bahi, 2015). La vitamine C est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présents dans les fluides intra- et extracellulaires (Bougurene, 2012).

L'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase) est empêché par cet antioxydant (vitamine C). Au cours de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle prend une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle principale dans la régénération de la vitamine E oxydé (Bahi, 2015).

## 5.4 Proline

La proline est l'un des antioxydants non enzymatiques dont les plantes ont besoin pour agir contre les ROS ( $OH$  et  $O_2$ ) formés lors d'un stress salin (Benhamdi, 2014). Son accumulation considérée comme un bon paramètre pour évaluer l'effet de la salinité (Ameur, 2014).

La proline remplit plusieurs fonctions tels que : la stabilisation de protéines et de complexes macromoléculaires, piégeage de radicaux libres, régulation de potentiel redox cellulaire, inhibition d' LPO. Sa concentration intracellulaire dépend d'une régulation fine entre sa biosynthèse et sa dégradation.

La proline a la capacité de piéger les ROS et l'inhibition de l'apoptose induite par les ROS (Benhamedi, 2014).

## 1. Endophyte : Origine, évolution et définition

De Barry (1866), est le premier qui a introduit le terme endophyte. En traduction littérale, ce mot endophyte est dérivé du grec : « Endo » ou « Endon » c'est-à-dire « intérieur », et « phytes » ou « phyton » c'est-à-dire « plante » (Pirttilä et Maria., 2001). Bien que le terme "endophyte" soit employé pour tous les organismes qui habitent dans les plantes (Schulz et Boyle., 2006).

La définition la plus complète serait que les endophytes sont des bactéries ou des champignons qui, durant tout ou une partie de leur cycle de vie, envahissent les tissus vivants des plantes. Ils causent des infections inapparentes et asymptomatiques, entièrement à l'intérieur des tissus végétaux, mais ne causent aucun symptôme de maladie (Wilson, 2012).

L'association entre plante - endophyte est le plus souvent mutualiste, Cependant, les recherches ont commencé à s'intéresser aux endophytes (Moricca et Ragazzi., 2008).

Maintenant les champignons endophytes sont considérés comme une source de plusieurs métabolites d'intérêt tels les composés antimicrobiens, antioxydants, anticancéreux, insecticides, etc... (Strobel *et al.*, 2004).

## 2. Biologie et diversité écologique des champignons endophytes

Les champignons endophytes représentent un groupe important avec une estimation de 1,5 millions d'espèces.

La flore fongique endophyte représente un groupe écologique et taxonomique très varié, presque tous les champignons appartiennent au phylum des *Ascomycota*. Bien que, certains appartiennent à d'autres taxons comme par exemple : les *Deuteromycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* et les *Oomycota* (kouadria, 2019).

Les endophytes sont souvent issus de l'embranchement *Ascomycota* et possèdent une grande biodiversité. Ils sont hétérotrophes et prélèvent des nutriments à l'hôte sans que celui-ci ne présente pas de signes de maladie. Ils sont capables de se multiplier dans le milieu extracellulaire ou intracellulaire.

Les champignons sont des microorganismes ubiquistes, ils ont été trouvés presque dans toutes les espèces de plantes, dans tous les niveaux.

Un champignon endophyte est capable de coloniser plusieurs hôtes différentes (Sénéquier-Crozet et Canard, 2016).

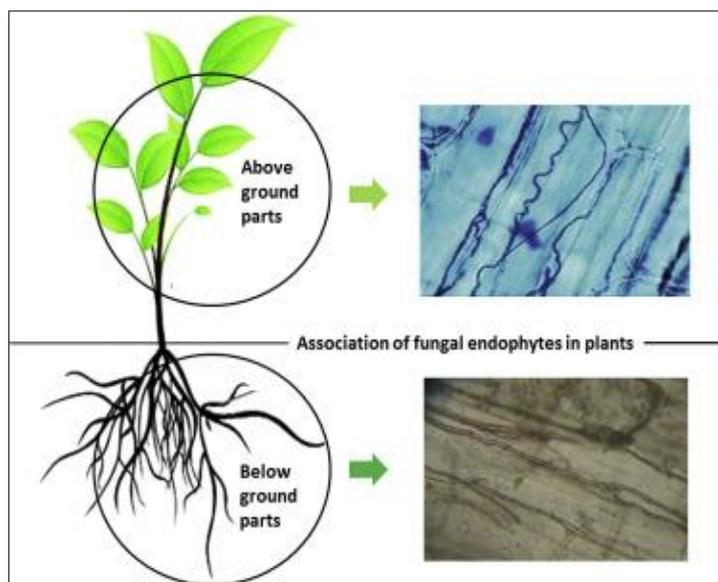
Ces microorganismes se divisent en deux grandes catégories, **les endophytes Clavicipitaceae** et **les non-Clavicipitaceae** (Zerroug, 2021), selon leurs modes de transmission de colonisation, taxonomie, hôtes, spécificités tissulaires et leurs fonctions écologiques.

## 2.1 Nature de l'interaction plante/champignons endophytes

Les myco-endophytes peuvent mettre une relation plus étroite avec leurs hôtes et ainsi, ils ont un rôle très important dans la protection contre les différents types de stress abiotiques et biotiques et de ce fait, sont capables d'interagir plus longtemps avec la plante.

Cette interaction peut provoquer des effets comme : une promotion de la croissance la plante, une protection via l'induction de l'ISR (Induced Systemic Resistance) ou une résistance systémique induite ou une action antagoniste directe sur les agents pathogènes.

Toute interaction plante-champignon endophyte est réalisée par un contact physique entre la plante et le champignon (**Figure5**), à l'aide de plusieurs barrières physiques présentent des bienfaits tels que la tolérance à la salinité, la sécheresse, et la promotion de la croissance.



**Figure 5:** photo qui représente l'interaction plantes / champignons endophytes.

(<https://images.app.goo.gl/8LWtpTrgWu2P3U9SA>)

### 3. Rôle des endophytes dans la tolérance aux stress abiotique

Les stress abiotiques ont un impact néfaste aussi bien sur la morphologie que sur la Physiologie des plantes, ce qui endommage la régulation génétique des voies cellulaires provoquant une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène, un dysfonctionnement de la membrane et un déséquilibre hormonal. L'augmentation de la résistance des plantes hôtes aux différents stress abiotiques est l'un des bienfaits les plus essentiels dans l'interaction symbiotique associant les champignons endophytes et leurs hôtes (Zerroug, 2021).

La tolérance aux stress abiotiques se fait à l'aide de plusieurs mécanismes parmi les : l'induction et l'expression des gènes sensibles aux stress, la formation de molécules de piégeage tel les espèces réactives de l'oxygène (ERO), la production de métabolites antistress (Zerroug, 2021).

Les champignons endophytes ont la capacité aussi de réguler les activités physiologiques de leurs plantes hôtes contre le stress abiotique en libérant ou en développant la compétence de leurs hôtes à produire des phytohormones. Ces molécules deviennent de composés de signalisation lors des stress et réagissent différemment. L'indole acide 3-acétique joue un rôle dans le contrôle de la croissance des racines en présence de stress salin, empêchant la production de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et en améliorant la croissance globale des plantes, l'acide abscissique contrôlé la fermeture des stomates afin de baisser la perte de l'eau au cours du stress hydrique, et le développement des plantes et leur croissance dans des conditions stressantes (Zerroug, 2021).

Les plantes sont exposées à des conditions environnementales modifiables, qui nécessitent l'adaptation à ces paramètres changeables. Plusieurs études ont démontré que les champignons endophytes associées à des plantes, ont la capacité de défendre la plante contre la sécheresse, les températures extrêmes, les insuffisances d'eau les produits chimiques, la toxicité des métaux et enfin salinité élevée (Kouadria, 2019).

## 4. *Aspergillus*

### 4.1 Généralités

Les champignons endophytes sont des microorganismes eucaryotes uni- ou pluricellulaires, hétérotrophes et ubiquistes incluant des espèces macroscopiques ou microscopiques d'aspect filamenteux ou lévuriforme. Parmi ces endophytes les *Aspergillus* sp. ont une large répartition géographique, ils se trouvent généralement associés aux régions à

climat chaud ; et ils se développent plus souvent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, les denrées alimentaires, le compost, et les céréales (Tabuc, 2007). La plupart des *Aspergillus* se reproduisent de façon asexuée, mais il existe d'autres espèces qui se reproduisent de façon sexuée (Beaudet, 1999).

Certaines espèces d'*Aspergillus* sp. ont un rôle très important dans l'industrie agro-alimentaire et dans la fabrication des produits pharmaceutiques, cosmétiques et biotechnologiques notamment pour la fermentation de divers substrats et la production d'enzymes ou d'acides organiques (Bennett, 2010).

#### 4.2 Classification

En 1729, Micheli a été mise en place pour la première fois la taxonomie du genre *Aspergillus*.

Selon : (Makhlouf, 2019)

Règne : Fungi

Embranchement : Ascomycota

Sous-embranchement : Deuteromycotina

Classe : Eurotiomycètes

Ordre : Eurotiales

Famille : Trichocomaceae

Genre : *Aspergillus*

### 5. Mécanismes de résistance ou tolérance d'*Aspergillus* sp. au stress salin

Les champignons endophytes comprenant un grand arsenal de métabolites Secondaires très variées structurellement, ils ont plusieurs activités biologiques comprenant l'activité antibactérienne, antifongique, antivirale, anticancéreuse, antidiabétique et antioxydante etc. (Zrrouge, 2021).

Les *Aspergillus* pourraient avoir la capacité d'éliminer les ROS et de réduire l'effet délétère du stress salin sur les plantes hôtes (Ali *et al.*, 2021). Selon les résultats de (Li *et al.*, 2017) ont montré qu'*Aspergillus* sp. semble conférer la tolérance au sel des plantes en modifiant les indices physiologiques et biochimiques. Il a été employé pour accélérer la croissance des plantes et atténuer le stress salin, ce qui implique plusieurs mécanismes importants de la tolérance des plantes à la salinité par *Aspergillus* sp. qui peut améliorer l'efficacité photosynthétique des plantes ; réduire l'activité des enzymes antioxydantes et les

dommages oxydatifs ; améliorer l'acquisition de K, diminuer l'accumulation de Na, maintenir le rapport  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  approprié et rétablir l'homéostasie ionique ; réguler la synthèse des métabolites et modifier la concentration des métabolites (acides aminés et sucres solubles).

Le stress salin a eu un effet négatif important sur la croissance et le développement des plantes. Cependant, l'utilisation d'*Aspergillus* sp. a inversé l'effet négatif et a soutenu la croissance sous le stress salin. Par conséquent, ce champignon peut utiliser comme biofertilisant pour soutenir l'agriculture dans des conditions du stress biotique et abiotique (Ali *et al.*, 2021)

# **Matériel et méthodes**

## 1. Objectif

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de génie microbiologique et applications à Chaàberssas.

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence l'activité antioxydante (catalase) chez un champignon endophyte du genre *Aspergillus* sp. sous l'effet d'un stress salin.

## 2. Matériel biologique

La souche provient de la collection du laboratoire de Biologie et Environnement de l'université frères Mentouri Constantine 1, elle a été isolée à partir des racines saines d'une plante hyperaccumulatrice de sels et de métaux *Hedysarum pallidum* Desf. Poussant sur les déblais miniers de la région d'Ain Babouche de la wilaya de Oum El'bouaghi.

## 3. Réactivation de la souche

L'isolat fongique préalablement conservé dans une gélose inclinée, nous avons pris à l'aide d'une anse de platine un inoculum puisensemencée par une touche centrale dans une boîte de pétri qui est déjà coulée par le milieu PDA (pomme de terre dextrose agar) (**annexe1**), après incubation dans l'étuve à 30°C pendant 4 -5 jours, la souche obtenue a été utilisée pour la préparation des cultures solides et submergés pour notre étude.

## 4. Identification

L'identification est effectuée par deux techniques principales : l'observation macroscopique et l'observation microscopique de la souche cultivée sur milieu PDA (**annexe1**).

### 4.1 Identification macroscopique

L'identification macroscopique se fait à l'œil nue en décrivant l'aspect, la couleur, la surface, la taille et le revers de colonies.

### 4.2 Identification microscopique

L'identification microscopique est réalisée par la technique du ruban adhésif (scotch), nous avons préparé au préalable une lame en déposant au centre une goutte de lactophénol, puis coupée un morceau de ruban adhésif qui est déposée sur les colonies, après placé ce dernier sur la lame et passé à l'observation sous microscope optique à grossissement  $\times 40$  (Chabasse *et al.*, 2002).

## 5. Culture et suivie de la croissance des souches fongiques sous stress salin

### 5.1 Culture solide

Pour étudier la tolérance à la salinité de l'isolat fongique d'*Aspergillus* sp. Nous l'avons cultivé dans la gélose YPD (**annexe1**) supplémenté à des différentes concentrations de NaCl selon Bouda et Haddioui.( 2010) : 0 %(témoin), 5%, 10%,15%, et 20% (**annexe 1**). Chaque boîte de Pétri contient un disque mycélien de 5 mm de diamètre d'*Aspergillus* sp. Incubée dans l'étuve (memmert) pendant 4jours à une température de 30°C, (trois répétitions ont été effectuées pour chaque concentration) (**Figure 6**).

Le meilleur développement est déterminé par la mesure du diamètre de la croissance mycélienne de la colonie fongique en la comparant au témoin.



**Figure 6:** étapes de la culture solide.

### 5.2 Culture submergée

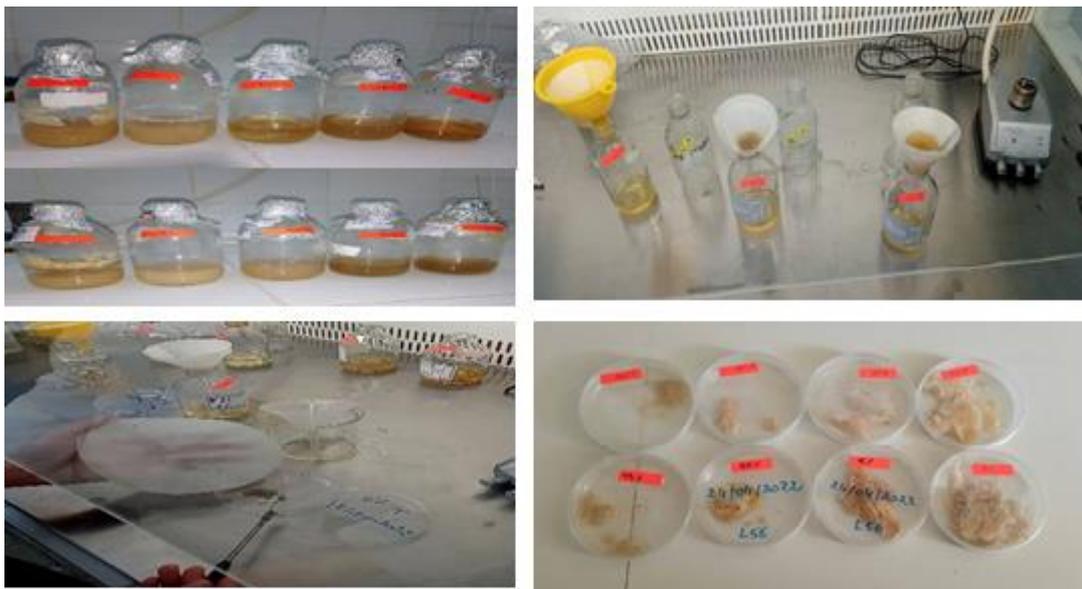
Dans la culture liquide nous avons utilisé le même milieu de culture qui est le bouillon YPD (**annexe1**), cette culture a été réalisée dans cinq flacons contenant 50 mL de bouillon YPD tamponné par le tampon citrate de sodium 50mM, pH 6.4 (**annexe2**), et cinq flacons de 50 mL de bouillon YPD non tamponné supplémentés par des concentrations croissantes de sel de : 0% (témoin) : 5 %,10 %,15 %,20 % (**annexe1**). Chaque flacon estensemencé par cinq (5) disques mycéliens de 5 mm de diamètre d'*Aspergillus* sp. Ensuite, incubé à 30°C pendant 4 jours dans un incubateur rotatif (New Brunswick Scientific) à 175 rpm (**Figure7**). La détermination de la concentration inhibitrice de la croissance et la meilleure concentration de développement (screening des concentrations) est marquée par une comparaison au témoin (0% de NaCl), et le poids total de la biomasse.



**Figure 7:** étapes de la culture submergée.

## 6. Préparation de la biomasse fongique

La biomasse a été récupérée après une croissance de 4 jours (96 h), puis filtrée sur papier whatman n°1, et mise dans un congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à son utilisation (**Figure 8**). Nous avons mesuré le pH du milieu après filtration. (Mukherjee *et al.*, 2010).



**Figure 8:** filtration et récupération de la biomasse.

## 7. Mesure de la teneur intracellulaire de $\text{H}_2\text{O}_2$

Selon la méthode de Chakraborty *et al.* (2014). La mesure de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a été réalisée par 0.5 g de biomasse fongique et fraîche et 4mL d'acide trichloroacétique (TCA) à 0.1% (w : v). Puis, le mélange est centrifugé dans une centrifugeuse réfrigérée à  $4^{\circ}\text{C}$  (sigma) à  $12000\times g$  pendant 15 min. le surnageant obtenu est utilisé pour le dosage du peroxyde d'hydrogène.

Nous avons pris 0.5mL de tampon phosphate 10mM (pH 7,0) et 1 mL du KI 1M (**annexe 3**) ont été ajoutés à 0,5mL de surnageant. L'absorbance est lue à 390 nm, et le taux de  $\text{H}_2\text{O}_2$  est

déterminé à partir d'une courbe d'étalonnage (annexe 5) (Chakraborty et *al.*, 2014).

## 8. Mesure de l'activité enzymatique

### 8.1 Préparation de l'extrait enzymatique

Nous avons préparé les extraits enzymatiques comme suit, 0,5g de biomasse fongique fraîche (issue de la culture témoin et celle avec les différentes concentrations de NaCl tamponnée et non tamponnée) broyée dans l'azote liquide.

Ensuite, l'extrait brut qui contient les enzymes recherchés a subi une extraction à 4 °C avec 5 mL de tampon phosphate de potassium de 50 mM, pH 7 qui été conservé dans un réfrigérateur à 4°C.(annexe2) contenant 0,1% de triton x -100(w/v) et 1% de polyvinylpyrrolidone (PVP) (w/v) ( annexe3). L'homogénat a été centrifugé à 14000 ×g à 4 °C pendant 20 min (**Figure 9**), le surnageant a été récupéré pour déterminer l'activité antioxydante pour le dosage de la catalase (Mukherjee et *al.*, 2010).



**Figure 9:** broyage et centrifugation de l'extrait enzymatique.

### 8.2 Dosage de la catalase (CAT)

Selon la méthode de Chance et Maehly. (1955). L'activité de la catalase a été mesurée comme suite :

La préparation du mélange réactionnel (3mL) est effectuée par addition de 0,1 mL d'extrait enzymatique et 2,9 mL de peroxyde d'hydrogène dans le tampon phosphate 50 mM à pH7. La décomposition du peroxyde d'hydrogène est mesurée par le spectrophotomètre (perkinElmer) à 240 nm.

Au cours des 3 premières minutes nous avons mesurés les variations de l'absorbance chaque minute. L'activité spécifique de la CAT correspond à la quantité du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consommée par mg de protéine.

### **8.3 Dosage des protéines totales**

Selon la méthode de Lowry *et al.* ( 1951). Nous avons mis 0.2mL d'extrait enzymatique dans un tube à essai sec et stérile, puis ajouté 2mL de solution M et 0,2 mL de solution E (**annexe4**), le mélange est vortex immédiatement et incubé à l'obscurité pendant 45min. L'absorbance est lue à 750 nm par un spectrophotomètre (JENWAY).

Les concentrations des protéines sont quantifiées par une courbe d'étalonnage de BSA comme un standard (**annexe5**).

# **Résultats et discussion**

Cette partie représente l'ensemble des résultats obtenus et implique plusieurs paramètres :

- 1- L'identification macroscopique et microscopique d'isolat fongique d'*Aspergillus* sp.
- 2- L'étude de la tolérance d'*Aspergillus* sp. l'NaCl à des différentes concentrations (0%,5%,10%,20%).
- 3- L'étude de l'influence de la salinité sur le pH du milieu de culture et leur effet sur l'activité antioxydante de la catalase, et les protéines totales.

## 1. Identification de l'isolat fongique

### 1.1 Caractères cultureux d'*Aspergillus* sp.

L'identification d'une espèce fongique repose sur l'analyse des critères cultureux (température, vitesse de croissance, milieux favorables et morphologiques). Ces derniers sont divisés sur deux aspects :

**Caractères macroscopiques** (aspect, couleur, surface, taille et reverse des colonies) et **caractères microscopiques** (appareil végétatif, type et la structure d'hyphe, la forme et la couleur des spores) (Chabasse *et al.*, 2002).

#### 1.1.1 Caractères macroscopiques

Après 96 heures d'incubation à 30°C. Nous avons fait la lecture des colonies d'*Aspergillus* sp. sur boîte de pétri (**Figure10**), et les résultats observés sont rassemblés dans le **tableau1**.

**Tableau 1:** caractères macroscopiques des colonies d'*Aspergillus* sp.

Milieu	Température	Aspect	Couleur		surface	Taille
PDA	30°C	Laineuses	Recto	Verso	Plate	Grosse colonie de diamètre environ de 2.5à 4cm
YPD			Blanchâtres à jaunâtre avec de nombreux petits sclérotés noirs	Jaune		



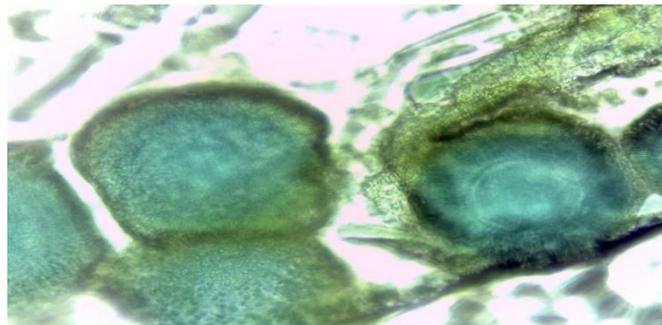
**Figure 10 :** aspect des colonies d'*Aspergillus* sp. après 5 jours.

### 1.1.2 Caractères microscopiques

L'observation microscopique de la souche fongique a été effectuée sous microscope optique grossissement x40, les résultats obtenues sont représentés dans le **tableau 2**, nos résultats concordent avec les résultats de (Chabasse *et al.*, 2002), qui confirment que notre souche est *Aspergillus sp.*(**Figure13**).

**Tableau 2:** caractères microscopiques des colonies d'*Aspergillus sp.*

Cratères	Appareil végétatif	Type d'hyphe	Structure d'hyphe			Forme et couleur des spores
			Les conidiophores	Conidies	Phialides	
Description	thalle non cloisonné	Hyalin	Long	Globuleuses	Portées par des métules	Rond, claires, plus au moins colorées ou jaunâtres



**Figure 11 :** aspect microscopique d'*Aspergillus sp.* au grossissement x40.

## 2. Etude de la tolérance d'*Aspergillus sp.* à la salinité

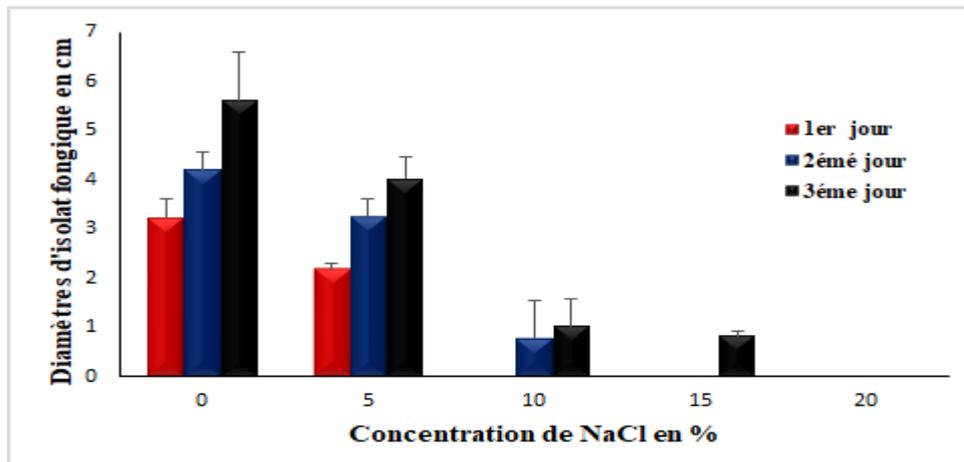
### 2.1. Effet de NaCl sur la croissance d'*Aspergillus sp.* sur milieu solide

La **figure 12** ci-dessous montre la tolérance d'*Aspergillus sp.* au stress salin sur le milieu YPD gélosé.

Dans le premier jour nous avons observés une légère croissance d'*Aspergillus sp.* Dans les concentrations (0% et 5%). Par contre les autres différentes concentrations (10% ,15%,20% d'Na Cl) n'ont pas de croissance mycélienne.

Au deuxième jour, nous avons observés une bonne croissance de la souche dans les concentrations (0%,5%,10%) par rapport au 1<sup>er</sup> jour, contrairement au 15% ,20% qui n'ont enregistrés aucun développement, donc le diamètre de croissance d'*Aspergillus sp.* diminue progressivement lorsque la concentration de NaCl augmente.

Pour le troisième jour, nous avons obtenus une meilleure croissance mycélienne par rapport aux deux jours précédents. On observe un développement maximal (5,61cm) en absence de sel (0%témoin), tandis que le développement d'*Aspergillus* sp. est décroissant avec les différentes concentrations (5% ,10%,15%).Bien que, on a aucune croissance du 20%, donc elle est inhibitrice pour *Aspergillus* sp.



**Figure 12:** représente les diamètres de la croissance d'*Aspergillus* sp. pendant les trois premiers jours sur le milieu YPD supplémenté par des différentes concentrations de NaCl.

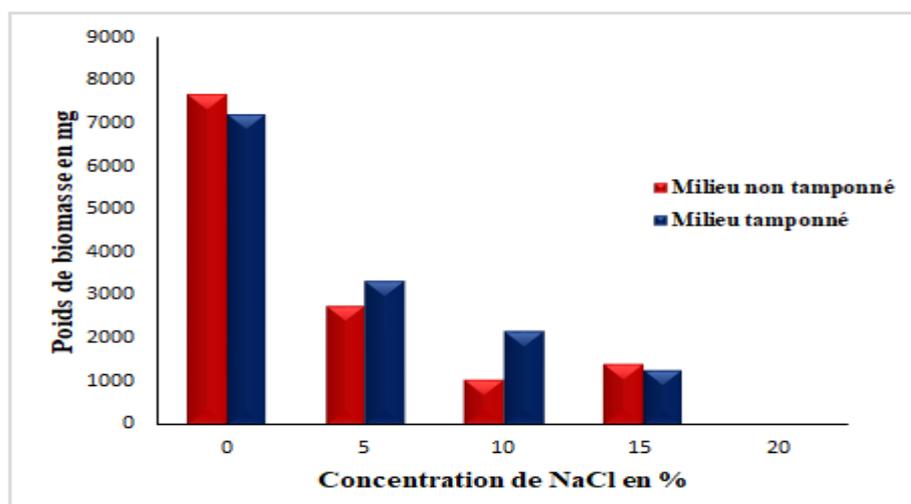
Selon nos résultats le stress salin provoque une diminution de la croissance d'*Aspergillus* sp.. qui est minime par rapport au témoin, cela est confirmé par des études précédente de (Li *et al.*, 2017 ; Jim *et al.*,2020) qui ont signalés que les concentrations croissantes de NaCl, provoquant un effet de ralentissement de la croissance d'*Aspergillus* sp. et ce dernier utilise des différentes stratégies pour tolérer le stress salin, telles que les stratégies morphologiques, le renforcement des parois cellulaires et la modification des structures génétiques.

## 2.2 Effet de NaCl sur la croissance d'*Aspergillus* sp. sur milieu liquide

La tolérance d'*Aspergillus* sp.au stress salin est réalisé sur le bouillon YPD tamponné et non tamponné, représenté par la Figure ci- dessous (**Figure 13**) qui montre une diminution brutale de la biomasse fongique sur le milieu YPD non tamponné et tamponné a une concentration de 5 % de NaCl par rapport au témoin 0% de NaCl, c'est du à l'adaptation de la souche au stress salin induit.

Tandis que nous observons une faible de diminution de croissance dans les autres concentrations de 10% et de 15% par rapport à la concentration de 5% de NaCl .Cela confirme que notre souche elle s'est adaptée au stress salin induit. Cela revient à notre souche qui a développé une résistance à ce changement induit en modifiant l'indice physiologique et biochimique.

Par contre nous observons une absence de production de biomasse dans la concentration de 20% de NaCl dans les différents milieux, cela explique que cette dernière est inhibitrice pour notre souche fongique.



**Figure 13:** poids de biomasse d'*Aspergillus* sp. Après 96h d'incubation sur le bouillon YPD tamponné et non tamponné supplémenté par des différentes concentrations de NaCl.

Nous avons noté une diminution de la biomasse fongique en fonction de l'augmentation des concentrations de NaCl. Ces résultats sont conformes à ceux indiqués par (Xie et al., 2017) qui montre que *Aspergillus* sp. a de fortes caractéristique de résistance au sel comme le montre la présence de la biomasse à des concentrations élevés de NaCl (15%).

### 2.3 Effet de NaCl sur le pH du milieu de culture

Les variations du pH de milieu après 4 jours d'incubation (**Tableau 3**), montre une diminution progressive du pH sur bouillon YPD non tamponné lorsque les doses de NaCl sont augmentées. Alors que, le pH de bouillon YPD tamponné également en baisse avec les différentes concentrations croissantes de NaCl (5% ,10%,15%,20%).

**Tableau 3:** variations du pH du bouillon YPD tamponné et non tamponné en présence de différentes concentrations de NaCl après la croissance fongique.

Concentration de NaCl en %	Bouillon YPD non tamponné		Bouillon YPD tamponné	
	pH initial du milieu de culture	pH final du milieu résiduel	pH initial du milieu de culture	pH final du milieu résiduel
0	6.40	7.89	6.40	7.94
5	6.40	6.07	6.40	5.51
10	6.40	5.77	6.40	5.24
15	6.40	5.76	6.40	5.31
20	6.40	/	6.40	/

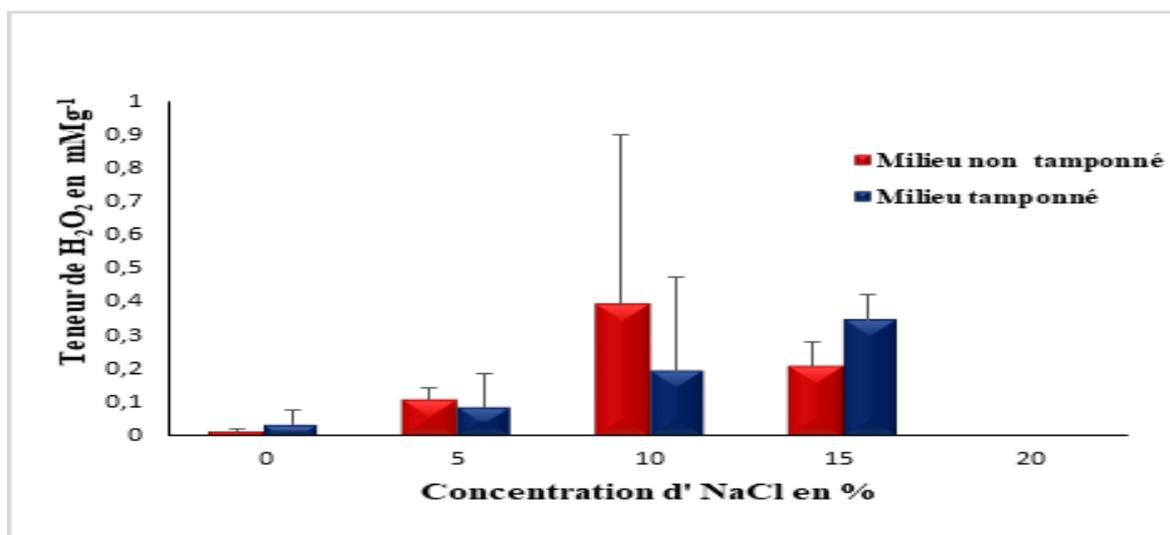
Donc, nous avons déduits que le tampon citrate permet la stabilisation du pH pour contrôler le stress généré par l'NaCl sachant que *Aspergillus* sp. est un producteur d'acide organique.

### 3. Effet de NaCl sur les biomarqueurs de toxicités

#### 3.1 Peroxyde d'hydrogène(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

La **figure 14** montre que la teneur d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> augmente sur le milieu YPD non tamponné avec les concentrations croissantes de NaCl jusqu'à une valeur optimale de 0,39 mM g<sup>-1</sup> en 10% de NaCl, après nous avons observés une légère diminution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui représente 0,20 mM g<sup>-1</sup> à une concentration de 15% de NaCl, mais par rapport au milieu YPD tamponné le peroxyde d'hydrogène augmente progressivement avec l'augmentation des concentration de NaCl avec une valeur optimale en 15% environ de 0,34 mM g<sup>-1</sup>.

Par contre nous observons une absence de production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les concentrations de 20% de NaCl. Cela est confirmé par l'absence de production de la biomasse dans cette dernière.



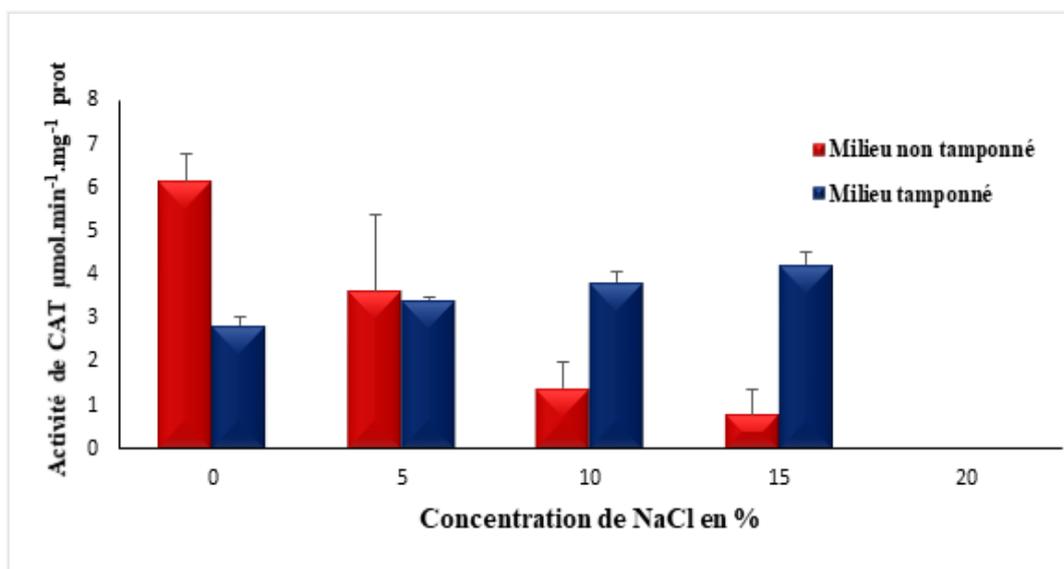
**Figure 14:** teneur intracellulaire en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> d'*Aspergillus* sp. sur le bouillon YPD tamponné et non tamponné supplémenté par des différentes concentrations de NaCl.

D'après les résultats, nous avons constatés que l'augmentation des concentrations de NaCl dans les deux milieux de culture induit une accumulation d'ROS principalement le peroxyde d'hydrogène. Ce dernier capable de réagir avec les ions de NaCl. Cela concorde avec (Kattab, 2007)

### 3.2 Catalase (CAT)

La **figure 15** représente l'activité de CAT d'*Aspergillus sp.* sur le bouillon YPD tamponné et non tamponné supplémenté par différentes concentrations de NaCl.

Nos résultats montrent qu'il y a une diminution progressive de l'activité de la catalase avec toutes les concentrations de NaCl dans le bouillon YPD non tamponné. Par contre, nous observons une augmentation de l'activité de la catalase sur le bouillon YPD tamponné.

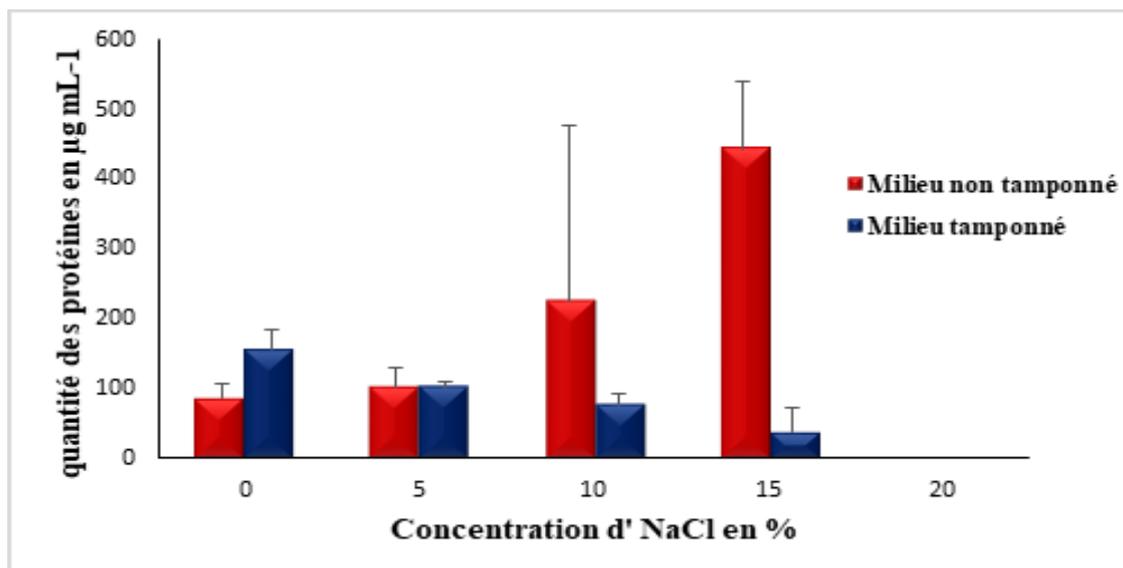


**Figure 15:** activités de la CAT d'*Aspergillus sp.* sur le bouillon YPD tamponné et non tamponné supplémenté par différentes concentrations de NaCl.

Selon nos résultats, l'activité de CAT d'*Aspergillus sp.* diminue progressivement avec l'augmentation des concentrations de NaCl dans le milieu non tamponné. De même, ces résultats sont similaires aux études de (Ali *et al.*, 2021) qui ont expliqué que cette diminution de l'activité de catalase est due à sa fonction de convertir  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$  et elle est donc considérée comme l'enzyme la plus efficace pour prévenir les dommages oxydatifs et neutraliser les ROS.

### 3.3 Protéines totales

D'après les résultats de la **figure 16**, la quantité des protéines totales augmente de manière progressive sur le bouillon YPD non tamponné, avec une augmentation maximale en 15% de  $442,95 \mu g mL^{-1}$ , et par contre nous remarquons une diminution progressive sur le milieu non tamponné.



**Figure 16:** quantité des protéines d'*Aspergillus* sp. sur le bouillon YPD tamponné et non tamponné supplémenté par différentes concentrations de NaCl.

Globalement, d'après les résultats représentés dans la **figure 16**, la quantité des protéines totales d'*Aspergillus* sp. augmentent progressivement en fonction des concentrations de NaCl dans le milieu non tamponné jusqu'à (15%), ce qui explique que, plus que la cellule est dans un état de stress plus que la production des protéines est élevée, cette dernière joue un rôle important dans la protection des cellules contre les dommages des composés cellulaires causés par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en augmentant la production de l'enzyme de la catalase.

D'autre part, la production des protéines très basse dans le milieu tamponné due à l'effet de tampon qui minimise le stress salin pour assurer le bon fonctionnement des cellules.

# **Conclusion et perspectives**

Depuis la découverte des *aspergillus*, les chercheurs en sciences s'intéressent de plus en plus à ces microorganismes qui représentent une source abondante de nouveaux produits naturels bioactifs pouvant être exploités dans une grande variété de domaines médical, agricole et industriel.

Le présent travail, a permis d'étudier l'activité antioxydante chez un champignon endophyte du genre *Aspergillus* sp. sous l'effet des différentes concentrations de NaCl.

Dans un premier temps, la culture d'*Aspergillus* sp. sur milieu solide YPD contenant des concentrations progressives de NaCl de 0%, 5%, 10%, 15% et 20% , a permis de constater que l'isolat fongique a une bonne croissance dans les différentes concentration de NaCl jusqu'à 15% environ de (0.8cm)de diamètre . Dans les mêmes conditions la culture d'*Aspergillus* sp. sur bouillon YPD montre une bonne croissance ce qui confirme une bonne production de biomasse fongique environ de (1430mg) à 15% de NaCl.

Selon nos résultats, nous avons obtenus que la teneur de peroxyde d'hydrogène augmente en fonction d'accroissement de NaCl avec une valeur maximale de 0,34 mM g<sup>-1</sup> à 15%. D'autre part, on obtient une production forte et efficace de l'activité de catalase à 15% de 4.23µmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> contrairement aux autres différentes concentrations.

Par ailleurs, il existe une relation proportionnelle entre la production des protéines totales et l'augmentation de NaCl qui permet d'enregistrer une meilleure valeur à 15% de 442mg.mL<sup>-1</sup>.

L'une des principales constatations émanant de l'application du stress salin concerne les variations et la perturbation des activités métaboliques d'*Aspergillus* sp. Les résultats trouvés suggèrent qu'*Aspergillus* sp. a la capacité de tolérer la salinité et peut être utilisée dans un système de dépollution des sols car il possède des propriétés particulières de résistance naturelle à de nombreuses contraintes abiotiques.

Un tel travail ouvre de multiples perspectives qui consistent à développer notre recherche par l'étude de :

- Étudier l'impact de différent stress abiotique (thermique, hydrique...ect) sur la réponse antioxydante d'*Aspergillus* sp.
- Décrire d'autres paramètres liés aux systèmes antioxydants exemple (SOD, GPX, Proline...ect)
- Déterminer les modifications génétiques au niveau cellulaire par l'identification des gènes responsables dans la tolérance à la salinité et les autres stress.

**Références**  
**Bibliographiques**

A

- **Ali, R. Gul, H. Hamayun, M. et al. (2021).** *Aspergillus awamori* ameliorates the physicochemical characteristics and mineral profile of mung bean under salt stress. *chemecal and biological technologie in agriculture*, 8(9), 1-13.
- **Ameur, H. (2014).** Effet d'osmoprotecteurs naturels sur la restauration de croissance de *Streptomyces* et de plantes d'intérêt agricole sur sol salé ou aride. Thèse de doctorat : Microbiologie. Sétif : Université Ferhat Abbas Sétif 1,145p.
- **Arora, A., Sairam, R. K., Srivastava, G.C. (2002).** Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 82(10), 1227- 1238.
- **Arora, D.S., Chandra, P. (2010).** Assay of antioxidant potential of two *Aspergillus* isolates by different methods under various physio-chemical conditions. *Brazilian journal of microbiology*, 41, 765-777.
- **Arora, D.S., Chandra, P. (2011).** Antioxidant Activity of *Aspergillus fumigatus*, *ISRN Pharmacology*, 1-11.

B

- **Bahi, A. (2015).** L'effet protecteur des antioxydants naturels dans l'intoxication du mercure chez le rat Albinos Wistar (Aspects biochimiques, immunologiques et histologiques. Thèse de doctorat : Biochimie Appliquée. Constantine : Université Des Frères Mentouri-Constantine 1, 161p.
- **Beaudet, D. (1999).** mise au point de la pcr-*Aspergillus* en vue du diagnostic biologique de l'aspergillose invasive. Thèse de doctorat : Pharmacie. Grenoble : l'Université Joseph Fourier-Grenoble, 94p.
- **Benhamdi, A. (2014).** Etude Des Enzymes De Stress Oxydatif Chez *Hedysarum Pallidum Desf.* Et *Lygeumspartum L.* En réponse à la pollution du sol par l'antimoine. Thèse de doctorat : Biochimie Et Biotechnologie.Constantine : Université Constantine 1, 104 p.
- **Bennett, J.W. (2010).** An Overview of the Genus *Aspergillus*.[caister.com/Aspergillus](http://caister.com/Aspergillus), 2,1-17.
- **Biteur, N. (2012).** Essais d'utilisation du radis (*Raphanussativus*) dans la phytoremédiation (Biodépollution) au niveau du sol contaminé par pes métaux lourds (Plomb) : Etude du stress oxydatif et quelques paramètres enzymatiques. Thèse De Doctorat : Biochimie Appliquée : Université d'es-Seniaoran-Oran, 110 p.

- **Boublenza, F. (2013).** Etude du stress osmotique chez des *lactocoques* isolés delait de *Chamelle de timimoun*.Thèse de doctorat : Microbiologie appliquée.Oran : université Oran ,94p.
- **Bouda, S., Haddioui, A. (2011).** Effet du stress salin sur la germination de quelques espèces du genre *Atriplex*. *Nature & Technologie*, 5 ,72-79.
- **Bouguerne, B. (2012).** Conception et synthese de direve phenolyque et hotement fonncionalisées et etude de leurs propriétés biologique vis-à-vis des maladie cardiovasculaires (Athérosclérose). Thèse De Doctorat : Biochimie. Toulouse : Université De Toulouse, 197p.

### C

- **Chabasse, D., Bouchara, J.P., Gentile, L. et al. (2002).** Formation biologie médicale : les moisissures d'intérêt médical.Paris :Bioforma.159p.
- **Chakruboty, S., Mukhrejee, A., Khuda-Bukhsh, A. et al. (2014).** Cadmium induced oxidative stress tolerance in cadmium resistant *Aspergillus foetidus* : its possible rôle in cadmium bioremediation. *ecotoxicology and environmental safety*, 106, 46-53.
- **Chance, B., Maehly, A.C. (1955).** Assay of catalases and peroxidases. *Academic Press*.2, 764–775.
- **Chérifi, k., Anagri, A., Boufous, E. et al. (2017).**Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la croissance de six especes d'Acaci. *American journal of innovative research and applied sciences*, 4(4) , 105-113.
- **Chowdhary, P., Raj, A., Verma, A. et al. (2020).** Microorganisms for sustainable environment and health. India : Lena Sparks.492p.

### G

- **Garait, B. (2006).** Le stress oxydant induit par voie métabolique (Régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (Hyperoxie) Et effet de la glisodin. Thèse de doctorat : Biologie cellulaire. Gernobel : Université Jouseph Fourer - Grenoble 1, 195 p.

### H

- **Hopkins, W.G. (2003).** Physiologie végétale. 2e ed. De boeck. : serge ambour révision scientifique de Charles-Marie Evradr Boeck univ. 514 p.

- **Hosseyeni Moghaddam, M.S., Safaie, N., Soltani, J. et al. (2021).** Desert-adapted fungal endophytes induce salinity and drought stress resistance in model crops. *Plant Physiology and Biochemistry*, 160, 225–238.

## J

- **Jabnoute, M. (2008).** Adaptation des plantes au stress salin : caractérisation de transporteurs de sodium et de potassium de la famille HKT chez le riz. Thèse de doctorat : Physiologie végétale et biologie moléculaire. Montpellier : Montpellier SupAgro, 127 p.
- **Jim, I., Vald, G., Moreno-perlin, T. et al. (2020).** Haloadaptive responses of *Aspergillus sydowii* to extreme water deprivation : Morphology, Compatible solutes, and oxidative stress at NaCl saturation. *journal of fungi* ,316 (6).
- **Jonshthon, A, Brooth, C. (1983).** plant pathologist's pocket book. 2<sup>nd</sup> ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 439p.

## K

- **Kattab, H. (2007).** Role of glutathione and polyadenylic acid on the oxidative defense systems of two different cultivars of canola seedlings grown under saline condition. *australian journal of basic and applied sciences*, 1(3), 323-334.
- **Kouadria, R. (2019).** Contribution des champignons endophytes à la tolérance aux facteurs adverses (biotiques et abiotiques) des espèces cultivées : isolement des champignons endophytes et étude de leur contribution à la tolérance à la salinité ou à des polluants. Thèse de doctorat : Production agricole et développement agricole durable. Mostaganem : Université Abdelhamid Ben Badis-Mostaganem, 154 p.

## L

- **Li, X. Han, S. Wang, G. et al. (2017).** The Fungus *Aspergillus aculeatus* enhances salt-stress tolerance, metabolite accumulation, and improves forage quality in perennial ryegrass. *Fungal-mediated salt reponse in turfgrass*, 8, 1-13.
- **Lowry, O.H. Rose rough, N.J., Farr, A.L. et al. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275

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, 137 p.
- **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 Constantine1.147p.
- **Mesnoua, M. (2016).** Stress abiotiques sur atriplex halimus L : Effet des métaux lourds et caractérisation des biomarqueurs et bioindicateurs. Thèse de doctorat : Biotechnologie végétale. Mostaganem : Université Abdelhamid Ben Badis-Mostaganem ,122 p.
- **Middleton, N., Thomas, D. (1997).**World atlas of désertification. London : Arnold 182 p.
- **Mohamed Mahmoud, F. (2017).** Activités biologiques de champignons endophytes isolés du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Thèse de doctorat : Phytopathologie. El Harrach : Ecole nationale supérieure agronomique d'El Harrach ,189 p.
- **Møller, I., Jensen, P., Hansson, A. (2007).** Oxidative Modifications To Cellular Components In Plants. Annual review Of Plant Biology. 58(1), 459–481p.
- **Moradi, A., Tahmourespour, A., Hoodaji, M., et al. (2011).** Effect of salinity on free living-diazotroph and total bacterial populations of two saline soils. African Journal of Microbiology Research, 5(2), 144-148.
- **Moricca, S. Ragazzi, A. (2007).** Fungal endophytes in mediterranean oak forests : A Lesson from *discula quercina*. . Phytopathology, 98,380-386.
- **Mukherjee A., Das D., Mondal S.K. et al. (2010).** Tolerance of arsenate-induced stress in *Aspergillus niger*, a possible candidate for bioremediation. Ecotoxicology and environmental safety, 73,172-182.

N

- **Nehela, A. (2016).** Symbioses tellurique : Rôle de tolérance aux stress abiotique. Thèse de doctorat: Biotechnologie .Oran: université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, 172p.

O

- **Oukarroum, A. (2007).** Vitalité des plantes d'orge (*Hordeum vulgare* L.) en conditions de stress hydrique et thermique analysée par la fluorescence chlorophyllienne. Thèse doctorat : botanique et biologie végétale. Genève : Université De Genève ,184p.

P

- **Pirttilä, M.N., Maria, A. (2001).** Endophytes In the Buds of Scots pine (*Pinus Sylvestris* L.). Thèse de doctorat: Département of biology and biochemistry. Finlande: University of Oulu, 52 p.

S

- **Schulz, B., Boyle, C. (2005).** The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109 (6), 661–686.
- **Semlali, R.M., Van oort, F., Deniax, L. (2001).** Estimating distributions of endogenous and exogenous Pb in soils by using Pb isotopic ratios. *Environmental science & Technology*, 35, 4180-4188.
- **Senequier-Crozet, A., Canard, B. (2016).** Les champignons endophytes : impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutique. Thèse de doctorat : Pharmacie. Grenoble : Université Joseph Fourier, 102p.
- **Sharma, N., Sharma, V., Abrol, V. et al. (2019).** An Update on bioactive natural products from endophytic fungi of medicinal plants.
- **Song, J., Feng, G., Tian, C. et al. (2005).** Strategies for adaptation of *Suaeda physophora*, *Haloxylon amodendron* and *Haloxylon persicum* to a saline environment during seed-germination stage. *Annals of Botany*, 96, 399–405.
- **Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., et al. (2004).** Natural Products from endophytic microorganisms. *Journal of natural products*, 67(2), 257-268.

T

- **Tabuc, C. (2007).** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat : Pathologie, mycologie, génétique et nutrition. Toulouse : Université de Toulouse ,190 p.

- **Treco, D.A., Lundblad, V. (1993).** Preparation of yeast media. Current protocols in molecular biology, 13.1.1-13.1.7

**V**

- **Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J. et al. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The international journal of biochemistry & cell biology. 39, 44–84.

**W**

- **Wilson, D. (2012).** Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition. Oikos, 73 (2), 274-276.

**X**

- **Xie, Y., Han, S., Li, X. et al. (2017).** Amelioration of salt stress on bermudagrass by the fungus *Aspergillus aculeatus*. electronic extra, 30(3), 245-254.

**Z**

- **Zerroug, A. (2021).** Champignons endophytes des plantes médicinales de la région de Sétif : Isolement, Identification et activités biologiques. Thèse de doctorat : Microbiologie. Sétif : Université Ferhat Abbas Sétif 1, 130 p.

# **Annexes**

## Annexe 1 : Les milieux de cultures

**1. Milieu de réactivation de la souche : PDA (Potato dextrose agar) (1000mL)** selon Jonnsthon et brouth, (1983).

Pomme de terre .....	200g
Glucose.....	20g
Agar .....	20g
Eau distillée.....	1000mL
pH 6.4	

### 2. Milieu de screening et de production de biomasse fongique

**2.1 Bouillon YPD non tamponné (500mL)** selon Treco et Lundblad. (1993).

Extrait de levure .....	5g
Peptone.....	10g
Glucose .....	10g
Eau distillée .....	500mL
pH 6.4.	

**2.2 Bouillon YPD tamponné (500mL)**

Extrait de levure .....	5g
Peptone.....	10g
Glucose .....	10g
Tampon citrate de sodium (50mM).....	500mL
pH 6.4	

**3. Milieu de détermination de diamètre : YPD gélosé (500mL) selon Treco et Lundblad, (1993).**

Extrait de levure .....	5g
Peptone .....	10g
Glucose.....	10g
Agar.....	10g
Eau distillée .....	500mL

pH 6.4

---

## Annexe 2 : Préparation des solutions tampons

### 1. Tampon citrate de sodium (50mM, pH 6.4)

#### Acide citrique (acide)

- ❖ Formule :  $C_6H_8O_7$
- ❖ Masse molaire : 192.124 g/mol

#### Citrate de sodium (base)

- ❖ Formule :  $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$
- ❖ Masse molaire : 294.0996 g/mol
  - ❖ Pour obtenir une solution de tampon a pH 6.4, On fait le titrage soit par l'ajout de l'acide ( $C_6H_8O_7$ ) à la base ( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ) ou bien par l'ajout de la base ( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ) à l'acide ( $C_6H_8O_7$ ).

### 2. Tampon phosphate de potassium (50mM, pH 7)

#### Phosphate monopotassique (acide)

- ❖ Formule :  $KH_2PO_4$
- ❖ Masse molaire : 136.09 g/mol

#### Phosphate dipotassique (base)

- ❖ Formule :  $K_2HPO_4$
- ❖ Masse molaire : 174.18 g/mol
  - ❖ On fait le titrage par l'ajout de solution qui contient Phosphate monopotassique à la solution de Phosphate dipotassique ou bien inverse pour obtenir un tampon de pH 7.

### 3. Tampon phosphate de potassium (10mM, pH 7)

- **Solution 1** : Dihydrogénophosphate de potassium ( $KH_2PO_4$ ) dans 500mL eau distillée.
- **Solution 2** : Hydrogénophosphate de potassium ( $K_2HPO_4$ ) dans 500mL eau distillée.
  - ❖ On mélange les deux solutions pour faire le titrage jusqu'à pH 7.

---

### Annexe 3 : Préparation des solutions d'extraction

#### 1. Solution d'extraction des enzymes

Polyvinylpyrrolidone (PVP).....	1g
Triton X-100.....	0.1mL
Tampon phosphate de potassium (50mM, pH 7).....	100 mL

#### 2. Solutions de détermination de l'activité de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

- **Solution 1 :**

L'acide trichloroacétique(TCA).....	0.1g
Tampon phosphate de potassium (10mM, pH 7).....	100 mL

- **Solution 2 :**

L'iodure de potassium(KI).....	8.3g
Tampon phosphate de potassium (10mM, pH 7).....	50mL

---

**Annexe 4 : Dosage des protéines Totale par méthode de Lowry et *al.* (1951)****🧪 Réactifs****Solution A :**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.....2g

NaOH (0,10 N).....100mL

**Solution B :**CuSO<sub>4</sub>.5 H<sub>2</sub>O.....1g

Eau distillée.....100mL

**Solution C :**

Tartrate de sodium et de potassium.....2g

Eau distillée .....100mL

**Solution E :**

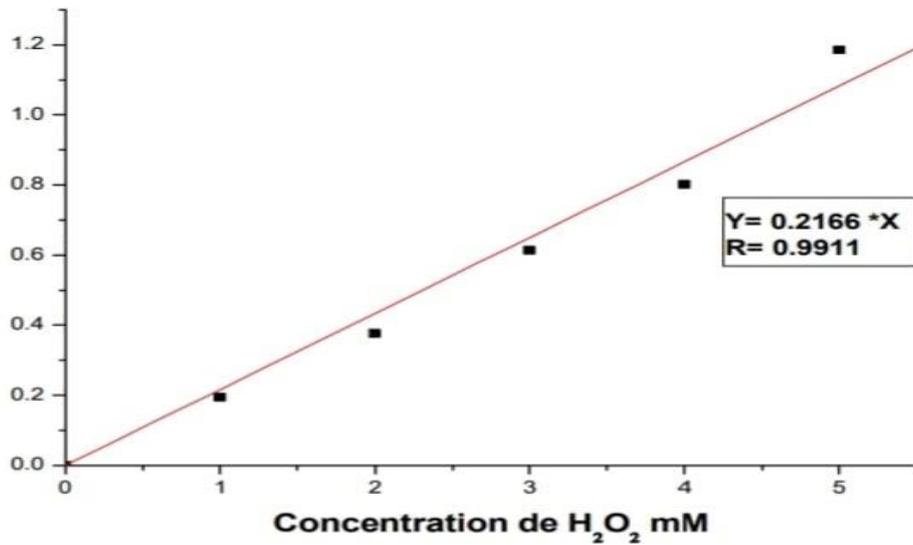
Folin-Ciocalteu.....50mL

Eau distillée .....50mL

**Solution M :** Mélanger 50mL Solution A ,50mL Solution B ,50mL Solution C.

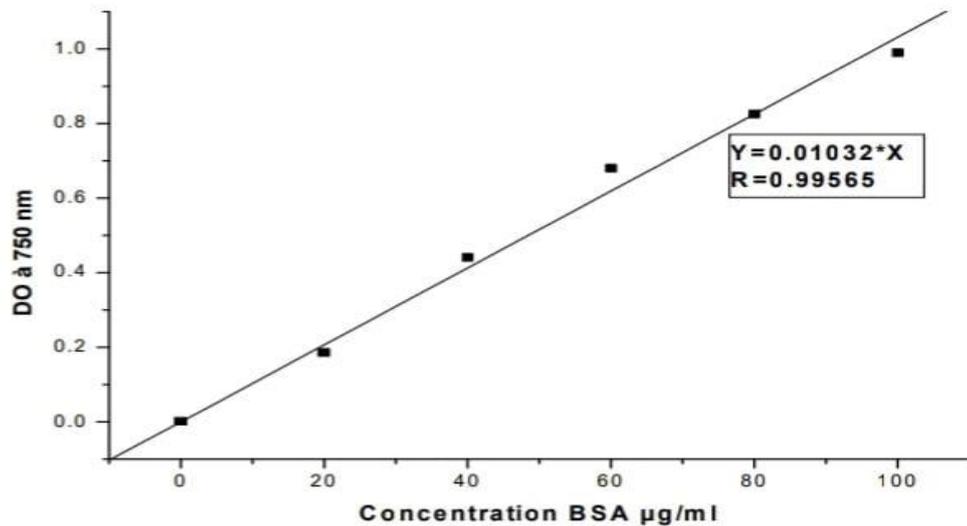
## Annexe 5 : Les Courbes d'étalonnages

### 1. Courbe d'étalonnage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :



Courbe d'étalonnage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Meghnous, 2020)

### 2. Courbe d'étalonnage de BSA :



Courbe d'étalonnage de BSA (Meghnous, 2020)

## Annexe 06 :Matériel de laboratoire utilisée

Appareils :

Nom de l'appareil	Photo (originale)	Nom de l'appareil	Photo (originale)
Hotte		pH mettre	
Etuve		Incubateur rotatif	
Balance		Spectroph- otomètre	

<p><b>Spectro- photomètre</b></p>		<p><b>Mortier</b></p>	
<p><b>Centrifuge use</b></p>		<p><b>Agitateur magnétique</b></p>	
<p><b>Vortex</b></p>		<p><b>Autoclave</b></p>	

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : BOUHENACHE KHAOULA  
BOULOUDNINE LAMIA  
KOUADRA SARA

**Thème : Impact du stress salin sur la réponse antioxydante du genre d'*Aspergillus* sp.**

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

### Résumé

Au cours de ces dernières années, la pollution des sols par la salinité est l'un des problèmes environnementaux le plus dangereux qui affectent en grande mesure la production végétale et la flore microbienne dans le monde. Les champignons endophytes associées aux plantes ont été reconnus comme l'un des facteurs clés pour aider les plantes hôtes à résister le stress salin. L'objectif de cette étude est d'analyser et d'expliquer la capacité antioxydante d'*Aspergillus* sp. sous l'effet des différentes concentrations de NaCl (0%,5%,10%,15% et 20%), réalisé par une culture solide et liquide qui permet de déterminer la croissance, la biomasse fongique et la mesure des activités antioxydantes d'*Aspergillus* sp. Nos résultats montrent que cette souche a une bonne croissance et production de biomasse jusqu'à 15% de NaCl environ de 1430 mg, cela confirme sa grande tolérance au sel. Nous avons confirmé qu'*Aspergillus* sp. à une activité de catalase efficace de 4.23  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  à 15% de NaCl qui est permet de détoxifié le peroxyde d'hydrogène a un taux maximale de 10% qui correspond à 0,39  $\text{mM g}^{-1}$ , ce qui explique l'augmentation de la production des protéines en 15% à une valeur de 442.95  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  ces derniers qui assurent la protection des cellules contre les dommages causés par  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ces résultats suggèrent qu'*Aspergillus* sp. capable de tolérer le stress oxydatif en développant des mécanismes de défense antioxydante, ce qui, confère à cette souche la capacité d'être exploitée pour l'élimination de la salinité des environnements contaminés.

**Mots-clés :** champignons endophyte, stress salin, réponse antioxydante, *Aspergillus* sp., catalase, stress oxydatif, peroxyde d'hydrogène.

### Laboratoire de recherche :

Laboratoire de génie microbiologique et application (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

### Jury d'évaluation :

**Encadreur :** BOULAHROUF Khaled (MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

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

**Examinatrice 2 :** ABDELAZIZ Ouidad (MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1).