

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



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

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

كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم الميكروبيولوجيا

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

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

**Filière :** Biotechnologie

**Spécialité :** Mycologie et Biotechnologie Fongique

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

**Impact du stress salin sur l'activité protéolytique du genre  
*Penicillium sp.***

---

Présenté par : **BENHAMOUDA Ikram**  
**MEZDOUR Meriem Nour El Imene**  
**FRIFET Dalel**

Le : 27/06/2022

**Jury d'évaluation :**

**Encadreur :** BOULAHROUF Khaled (MCB- UFM Constantine).  
**Examineur 1 :** MEGHNOUS Ouissem (MAB- UFM Constantine).  
**Examineur 2 :** KASSA-LAOUAR Mounia (MCB- UFM Constantine).

**Année universitaire  
2021 - 2022**

# Remerciements

*Nous remercions dieu le tout puissant nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire*

*Nous tenons particulièrement à remercier monsieur **BOULAHROUF Khaled** pour son encadrement exceptionnel, sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire*

*Nous remercions également Mme **MEGHNOUS Ouissem** et Mme **KASSA-LAOUAR Mounia** pour leurs aides précieuses à l'élaboration de la partie pratique de ce mémoire, leurs soutiens et leurs accompagnements et surtout leurs judicieux conseils, qui ont attribué à alimenter notre réflexion*

*Nous exprimons nos vifs remerciements à tous les professeurs qui ont participé à notre formation*

*Que toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce modeste travail trouvent ici nos sincères remerciements*

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail*

*A l'être le plus cher de ma vie, ma mère BENHAMOUDA*

*Fahima*

*A celui qui a fait de moi l'être que je suis, mon père*

*BENHAMOUDA Azzouz*

*A mes chers frères Akram et Lamine et chères sœurs Amina et*

*Ines pour l'encouragement et le soutien moral*

*A ma petite nièce Dania Rokia*

*A tous mes amis de la promotion de master 2 biologie*

*Une dédicace particulière à MEZDOUR Meriem Nour et  
FRIFET Dalel qui ont participé à la réalisation de ce modeste  
travail*

*A tous les membres de ma famille et surtout ma tante Mme*

*Benhamouda Toumia*

***Ikram***

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail*

*A ma très chère mère KISSOUM Latifa qui m'a soutenu  
et encouragé durant ces années d'études et pour ses sacrifices  
et sa patience.*

*A mon très cher père MEZDOUR Saifi pour l'encouragement.*

*Mon grand frère Mohammed.*

*A ma chère petite sœur Amina qui m'a aidé et supporté  
dans les moments difficiles et pour le soutien moral.*

*A mes adorables oncles, tantes, cousins et cousines ainsi  
qu'à toute la famille MEZDOUR et la famille KISSOUM.*

*A mes très chers grands-parents, auxquels je souhaite  
une longue vie en bonne santé Une dédicace particulière à  
BENHAMOUDA Ikram et FRIFET Dalel qui ont participé à la  
réalisation de ce modeste travail*

*A mes proches et à tous ceux que j'aime et que je respecte*

***Meriem***

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail*

*A mes très chers parents FRIFET Houssine ; BOUICHA  
Hafida, qui m'ont toujours entouré d'amour et de tendresse et  
qui n'arrêtent pas de me soutenir, de m'encourager et de me  
procurer tout ce dont j'ai besoin*

*A mon cher frère Islem pour L'encouragement*

*A la personne qui a toujours su m'épauler et me pousser à  
aller de l'avant mon mari LACHTAR Housseem, merci pour  
l'appui et l'encouragement et Merci d'être dans ma vie*

*A ma petite princesse mon cœur Eline J'espère te voir dans les  
plus hauts rangs, que Dieu te protège ma fille*

*Un grand merci aussi à mes amis à ma famille FRIFET À ma  
deuxième famille, la famille LACHTAR.*

*Une dédicace particulière à MEZDOUR Meriem Nour et  
Benhamouda Ikram qui ont participé à la réalisation de ce  
modeste travail.*

***Dalel***

## Résumé

Cette étude s'intéresse à l'évaluation de la tolérance de champignon endophyte *Penicillium sp.*, isolé des racines d'*Hedysarum pallidum Desf.* au stress salin. Pour cela deux concentrations en NaCl (0% et 5%) ont été testées sur l'activité protéolytique produite par cette souche. La mise en évidence de l'activité protéolytique a été effectuée sur milieu d'agar blanc à base de quatre substrats protéiques : la caséine, la *Bovine serum albumin*, l'hémoglobine et l'albumine par la mesure des diamètres des zones de lyses apparaissent autour de la biomasse fongique. Les résultats montrent que le diamètre le plus important est observé sur des boîtes contenant 0% de NaCl, il est de 54mm pour la caséine et à 5% de NaCl il est de 40.3mm pour la *bovine serum albumin*. Le dosage de l'activité protéolytique est réalisé pour des extraits endocellulaires et exocellulaires obtenus par fermentation submergée sur un milieu gélatiné à pH 6,8 et à 28°C, contenant les quatre substrats : caséine, *bovine serum albumin*, hémoglobine et albumine et à deux concentrations en NaCl (0% et 5%). L'activité protéolytique endocellulaire à 0% la plus importante est obtenue en présence de l'albumine qui est de 302,22UI, et à 5% en présence de la *bovine serum albumin* qui est de 269,62UI. Pour l'activité protéolytique exocellulaires à 0% la plus importante est obtenue en présence de l'hémoglobine qui est de 273,33UI, et à 5% en présence de la caséine qui est de 117,77UI. Cette étude montre que *Penicillium sp.* a la capacité de tolérer et de s'adapter même dans un milieu salin (5% de NaCl) par la sécrétion des enzymes protéolytiques.

**Mots clés :** stress salin, NaCl, *Penicillium sp.*, champignon endophyte, adaptation, activité protéolytique.

## **Abstract**

This study focuses on the evaluation of the tolerance of the endophytic fungus *Penicillium sp.*, isolated from the roots of *Hedysarum pallidum* Desf. to salt stress. For this purpose, two NaCl concentrations (0% and 5%) were tested on the proteolytic activity produced by this strain. Proteolytic activity was demonstrated on white agar medium based on four protein substrates: casein, bovine serum albumin, hemoglobin, and albumin by measuring the diameters of the lysis zones appearing around the fungal biomass. The results show that the largest diameter is observed on plates containing 0% NaCl. It is 54mm for casein and at 5% NaCl it is 40.3mm for bovine serum albumin. The proteolytic activity assay is performed for endocellular and exocellular extracts obtained by submerged fermentation on a gelatin medium at pH 6.8 and 28°C, containing the four substrates: casein, bovine serum albumin, hemoglobin, and albumin, and at two NaCl concentrations (0% and 5%). The highest endocellular proteolytic activity at 0% is obtained in the presence of albumin, which is 302.22IU, and at 5% in the presence of bovine serum albumin, which is 269.62IU. For the exocellular proteolytic activity at 0%, the most important is obtained in the presence of hemoglobin, which is 273.33IU, and at 5% in the presence of casein, which is 117.77IU. This study shows that *Penicillium sp.* has the ability to tolerate and adapt even in a saline environment (5% NaCl) through the secretion of proteolytic enzymes.

**Key words:** salt stress, NaCl, *Penicillium sp.*, endophytic fungus, adaptation, proteolytic activity.

## ملخص

تركز هذه الدراسة على تقييم تحمل الفطر الباطني *Penicillium sp.* معزول من جذور *Hedysarum pallidum* *Desf.* لإجهاد الملح. لهذا الغرض، تم اختبار تركيزين من كلوريد الصوديوم 0% و 5% على النشاط التحلل للبروتين الناتج عن هذه السلالة. تم إثبات نشاط تحلل البروتين على وسط أجار أبيض بناءً على أربع ركائز بروتينية: الكازيين، وألبومين مصل البقر، والهيموجلوبين، والألبومين عن طريق قياس أقطار مناطق التحلل التي تظهر حول الكتلة الحيوية الفطرية. أظهرت النتائج أن أكبر قطر لوحظ في العلب التي تحتوي على 0% من كلوريد الصوديوم، 54 ملم للكازيين و 5% من كلوريد الصوديوم، 40,3 ملم لألبومين المصل البقري. يتم تحديد نشاط تحلل البروتين للمستخلصات الخلوية الداخلية و الخارجية عن طريق التخمر المغمور على وسط جيلاتيني عند درجة الحموضة 6,8 و 28 درجة مئوية، ويحتوي على الركائز الأربع: الكازيين، وألبومين المصل البقري، والهيموجلوبين، والألبومين بتركيزي 0% و 5% من كلوريد الصوديوم، تم الحصول على أعلى نشاط بروتين خلوي داخلي عند 0% في وجود الألبومين وهو 302,22 وحدة دولية، وعند 5% لوحظ في وجود ألبومين مصل الأبقار وهو 269,62 وحدة دولية. بالنسبة لنشاط التحلل الخلوي الخارجي عند 0%، فإن الأهم لوحظ في وجود الهيموجلوبين وهو 273,33 وحدة دولية، وعند 5% لوحظ في وجود الكازيين وهو 117,77 وحدة دولية. تظهر هذه الدراسة أن *Penicillium sp.* لديه القدرة على التحمل والتكيف حتى في بيئة مالحة (5% كلوريد الصوديوم) عن طريق إفراز الإنزيمات المحللة للبروتين.

**الكلمات المفتاحية:** إجهاد الملح، كلوريد الصوديوم، *Penicillium sp.*، فطر داخلي، تكيف، نشاط تحلل البروتين.



## Liste des abréviations

<b>PDA:</b>	<i>Potato D'extrose Agar</i>
<b>BSA:</b>	<i>Bovine serum albumin</i>
<b>TCA:</b>	Acide trichloracétique
<b>PvP:</b>	Polyvinylpyrrolidone
<b>NaCl:</b>	Le chlorure de sodium
<b>NaOH:</b>	Hydroxyde de sodium
<b>CuSO<sub>4</sub>:</b>	Le sulfate de cuivre
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:</b>	Le carbonate de sodium
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:</b>	Phosphate de potassium monobasique
<b>Cl<sup>-</sup>:</b>	Ions chlore
<b>MgSO<sub>4</sub>:</b>	Le sulfate de magnésium
<b>KCl:</b>	Chlorure de potassium
<b>Na<sup>+</sup>:</b>	Ion sodium
<b>Hémo :</b>	Hémoglobine
<b>Endo :</b>	Endocellulaire
<b>Exo :</b>	Exocellulaire

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> effets bénéfiques potentiels de la colonisation des racines des plantes par des champignons endophytes symbiotiques dans des conditions de sol salin(Gupta <i>et al.</i> , 2021)...7	
<b>Figure 2:</b> liaisons peptidiques (entre un azote en bleu et un carbone en vert) hydrolysées par les protéases ( <a href="http://www.Futura-sciences.com">http://www.Futura-sciences.com</a> ).....9	
<b>Figure 3:</b> classification des protéases (Sharma <i>et al.</i> , 2019).....11	
<b>Figure 4:</b> applications des protéases dans divers secteurs et industries(Solanki <i>et al.</i> , 2021).12	
<b>Figure 5:</b> élimination des taches par une molécule détergente intégrée à une protéase(Gurumallesh <i>et al.</i> , 2019). ....13	
<b>Figure 6:</b> application des protéases fongiques dans l'industrie alimentaire(Naeem <i>et al.</i> , 2022).....14	
<b>Figure 7:</b> application thérapeutique globale des protéases(Gurumallesh <i>et al.</i> , 2019).....15	
<b>Figure 8:</b> photo prise de la préparation des protéines et le milieu de culture agar blanc sous la hotte. ....17	
<b>Figure 9:</b> incubation des milieux de fermentation à 0% et 5% de NaCl. ....18	
Figure 10: broyage de la biomasse. ....19	
<b>Figure 11:</b> photo prise qui montre l'ajout du TCA pour arrêter la réaction enzymatique. ....21	
<b>Figure 12:</b> aspect macroscopique de <i>Penicillium sp.</i> Après 6 jours d'incubation. ....22	
<b>Figure 14:</b> photo référenciée de la colonie <i>Penicillium sp.</i> (Chabasse <i>et al.</i> , 2002). ....22	
<b>Figure 13:</b> aspect microscopique de <i>Penicillium sp.</i> au grossissement *40. ....23	
<b>Figure 15:</b> photo référenciée de l'aspect microscopique de <i>Penicillium sp.</i> (Chabasse <i>et al.</i> , 2002).....23	
<b>Figure 16:</b> concentrations des protéines des extraits endocellulaires et exocellulaires à 0% et 5% de NaCl. ....26	
<b>Figure 19:</b> activité enzymatique endocellulaire en présence de quatre substrats à 0% et 5% de NaCl.....27	
<b>Figure 20:</b> activité enzymatique exocellulaire en présence de quatre substrats à 0% et 5% de NaCl.....28	

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> caractères cultureux des colonies de <i>Penicillium sp.</i> .....	23
<b>Tableau 2:</b> caractères microscopiques des colonies de <i>Penicillium sp.</i> .....	24
<b>Tableau 3:</b> diamètres des zones de lyse de <i>Penicillium sp.</i> à 0% et 5% de NaCl.....	24
<b>Tableau 4:</b> poids des biomasses à des différentes concentrations 0% et 5% de NaCl.....	25

## Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Abstract

ملخص

Introduction.....1

### Revue bibliographique

**1. Pollution..... 3**

1.1 Contamination du sol par le sel.....3

**2. Stress ..... 3**

2.1. Définition.....3

2.2. Types de stress abiotiques .....4

2.2.1. Stress thermique .....4

2.2.2. Stress hydrique .....4

2.2.3. Stress salin.....4

**3. Champignons endophytes ..... 5**

3.1. Mode de transmission et reproduction .....5

3.1.1. Transmission horizontale.....5

3.1.2. Transmission verticale.....6

**4. Relation endophytes-hôte..... 6**

**5. Tolérance des mycoendophytes au stress abiotique..... 7**

**6. Genre *Penicillium* ..... 8**

6.1. Définition.....8

6.2. Conditions de croissance .....8

6.3. Tolérance des endophytes du genre *Penicillium* au stress salin .....8

<b>7. Protéases des champignons endophytes .....</b>	<b>9</b>
7.1. Définition.....	9
7.2. Propriétés.....	9
7.3. Mode d'action.....	10
7.4. Classification .....	10
7.4.1. En fonction de leur site d'action.....	10
a) -Endoprotéases.....	10
b) -Exoprotéases .....	11
7.4.2. En fonction de leur pH optimal.....	11
<b>8. Application biotechnologiques des protéases .....</b>	<b>11</b>
8.1. Application dans l'industrie des détergents.....	12
8.2. Application dans l'industrie du cuir.....	13
8.3. Application dans l'industrie alimentaire .....	13
8.4. Application thérapeutique et pharmaceutique .....	14
8.5. Application dans l'industrie textile.....	15
8.6. Autres applications.....	15

## **Matériel et méthodes**

<b>1. Objectif du travail.....</b>	<b>16</b>
<b>2. Matériel biologique .....</b>	<b>16</b>
2.1. Réactivation de la souche fongique .....	16
2.2. Examen Macroscopique .....	16
2.3. Examen Microscopique.....	16
<b>3. Mise en évidence de l'activité protéolytique sur milieu solide .....</b>	<b>17</b>
3.1. Préparation des milieux.....	17
3.2. Préparation des protéines.....	17
3.3. Ensemencement .....	18
<b>4. Fermentation submergé .....</b>	<b>18</b>
4.1. Préparation des milieux de fermentation.....	18
4.2. Inoculation.....	18
<b>5. Mesure de l'activité protéolytique .....</b>	<b>19</b>
5.1. Extrait enzymatique exocellulaire.....	19
5.2. Extrait enzymatique endocellulaire.....	19

<b>6. Dosage des protéines .....</b>	<b>20</b>
<b>7. Dosage de l'activité protéolytique.....</b>	<b>20</b>
7.1. Préparation des solutions protéiques.....	20
7.2. Protocole de dosage.....	20
7.2.1. Première étape.....	20
7.2.2. Deuxième étape.....	21

### **Résultats et discussion**

<b>1. Identification de la souche fongique .....</b>	<b>22</b>
1.1. Caractères macroscopiques.....	22
1.2. Caractères microscopiques .....	23
<b>2. Mise en évidence de l'activité protéolytique .....</b>	<b>24</b>
<b>3. Effet de NaCl sur la croissance de <i>Penicillium sp.</i> en milieu liquide.....</b>	<b>25</b>
<b>4. Effet de NaCl sur l'activité protéolytique de <i>Penicillium sp.</i> en milieu liquide .....</b>	<b>26</b>
4.1. Protéines .....	26
4.3. Activité enzymatique.....	27
<b>Conclusion .....</b>	<b>29</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>31</b>
<b>Annexes</b>	

# **Introduction**

Dans certaines régions, les cultures agricoles sont limitées par l'accumulation de sels dans les sols. Ces excès de sels, plus couramment le chlorure de sodium (NaCl), affecteront négativement la croissance et la productivité des plantes. L'utilisation d'eau d'irrigation à haute salinité et l'application d'engrais contenant du sel sont les principaux facteurs à l'origine de l'augmentation de la salinité du sol. Le sel est responsable de la dégradation de plus de 40 millions d'hectares de terres irriguées, ce qui représente plus du tiers des terres arables de la planète (Ben yahmed, 2013).

L'Algérie est l'une des régions les plus riches en diversité génétique, où il est possible d'identifier une grande variété d'environnements agroécologiques. Toutefois, le caractère aléatoire des pluies annuelles et les contraintes abiotiques imprévisibles et sévères aggravent souvent la situation de l'agriculture algérienne (Bakhta, 2010). La salinité est l'un des principaux facteurs qui limitent la production culturale durable et la croissance des microorganismes bénéfiques (Çam, 2020).

Les chercheurs s'intéressent de plus en plus aux micro-organismes vivant dans des environnements extrêmes, parce qu'ils sont de précieux modèles d'évolution fonctionnelle qui ont des applications potentielles dans le domaine de la biotechnologie. Pendant l'adaptation physicochimique aux environnements rudes, ils peuvent obtenir des caractéristiques génétiques et métaboliques uniques, comparées aux microorganismes des environnements généraux (Chung *et al.*, 2022).

Le recours aux endophytes, isolés des hôtes halophytes, semble être une approche intéressante pour donner une tolérance au sel à une culture sensible au sel (Nanjundappa *et al.*, 2021). Il a été établi que les endophytes qui survivent à des conditions environnementales extrêmes (salinité, sécheresse, métaux lourds, température, etc.) sont avérés appropriés pour une utilisation dans différentes pratiques agricoles pour lutter contre l'impact de ces contraintes abiotiques sur la productivité agricole (Nanjundappa *et al.*, 2021).

Toute la flore terrestre est symbiotique avec les champignons. Ces derniers sont présents asymptomatiquement mais promeuvent souvent la performance de l'hôte en ce qui a trait à la croissance et à la résistance aux stress abiotiques (Rodriguez *et al.*, 2003).

Le genre *Penicillium* a fait l'objet d'une exploitation intensive au cours des deux dernières décennies, non seulement en tant que source de composés bioactifs, mais également pour



diminuer la pollution de l'environnement et améliorer le secteur agricole. Divers espèces d'endophytes de *Penicillium* sont caractérisées par des biocatalyseurs, des facteurs de croissance des plantes, des phytoremèdes et des producteurs d'enzymes. Ce mode de vie endophyte permet aux espèces de *Penicillium* la capacité de protéger les espèces végétales du stress abiotique (Toghueo et Boyom, 2020).

Dans notre étude nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- ✓ La mise en évidence des activités protéolytiques de *Penicillium sp.* sur milieu agar blanc contenant de la caséine, la BSA, l'hémoglobine et l'albumine à 0% et 5% de NaCl.
- ✓ Extraction des protéases endocellulaires et exocellulaires après une fermentation submergée à 0% et 5% de NaCl.
- ✓ Enfin, l'évaluation quantitative des activités enzymatiques endocellulaires et exocellulaires aux différentes concentrations en NaCl (0% et 5%) sur les substrats précédemment cités.

**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, l'eau et le sol est provoqué par le développement des activités industrielles (Biteur, 2012). 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 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 biens dans celles où les cultures dépendent de l'irrigation (Middleton et Thomoa, 1992).

## 2. Stress

### 2.1. Définition

On appelle stress l'ensemble des conditions qui provoquent des changements des processus physiologiques induisant éventuellement des dégâts, des blessures, des dommages, une 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 une 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 les 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 du végétal 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**

Le stress abiotique est l'un des facteurs non vivants qui ont un effet nuisible sur les organismes vivants dans un environnement spécifique créé soit naturellement ou par des actions humaines. Il affecte négativement la performance et la physiologie des individus (Nehla, 2016).

### **2.2.1. Stress thermique**

On définit le stress thermique lorsque les températures sont augmentées dans un temps suffisant pour qu'elles provoquent 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 végétaux, néanmoins, beaucoup d'entre elles induisent des modifications morphologiques et physiologiques qui leur 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 induit 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 être provoquée naturellement ou par les activités agricoles comme l'irrigation ou l'utilisation de certains types d'engrais (Jabnour, 2008).

L'excès salin ( $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ ) peut causer des problèmes de membranes, des inhibitions enzymatiques ou un dysfonctionnement métabolique chez les plantes (Hopkins, 2003). 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 végétaux.

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).

### 3. Champignons endophytes

Le terme endophyte est un mot grec en lequel (endo) signifie intérieur, et (phyton) signifie plante. En 1866, le scientifique *De Bary* a inventé le terme endophyte pour décrire les microorganismes présents dans les tissus des plantes. Les endophytes, principalement des bactéries et des champignons. Les endophytes ont d'abord été signalés en tant que mycélium résidant dans les graines de graminées de *Lolium Temulentum* par *Vogl* en 1898 (*Waghunde et al.*, 2021). Ils peuvent se développer de manière asymptomatique dans les tissus végétaux au-dessus et au-dessous du sol, y compris dans les tiges, les feuilles et/ou les racines (*Silva et al.*, 2022). Durant au moins une partie de leur cycle de vie, ils ne causent aucun dommage à la plante hôte, menant une interaction saprophyte, commensale ou mutualiste avec leur plante hôte (*Baron et Rigobelo*, 2022).

Les endophytes sont reconnus pour améliorer la croissance des hôtes et le gain en éléments nutritifs (*Gouda et al.*, 2016), grâce à la solubilisation des nutriments dans la rhizosphère des plantes.

#### 3.1. Mode de transmission et reproduction

##### 3.1.1. Transmission horizontale

La transmission horizontale pure se développe à travers un cycle de vie sexuel, qui dépend de la production de spores sexuelles contagieuses. Ces spores ne peuvent être produites que par une structure fongique (stroma) autour de la gaine foliaire de l'herbier. Les feuilles accumulent plusieurs infections peu après l'émergence par germination épiphyte des propagules fongiques, suivie par une pénétration cuticulaire ou une entrée à travers les stomates et se développent de manière intercellulaire dans les tissus sains (*Kaur*, 2020).

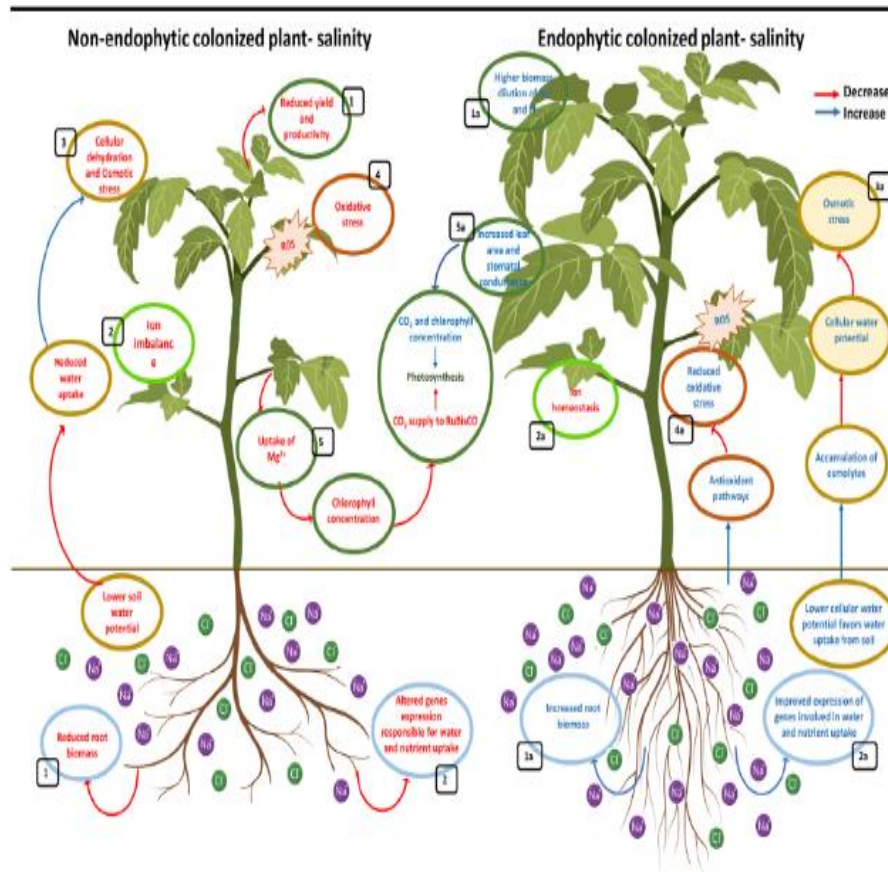
### 3.1.2. Transmission verticale

La transmission verticale pure consiste en une reproduction asexuée d'hyphes intercellulaires dans les tissus de la surface terrestre (Kaur, 2020).

## 4. Relation endophytes-hôte

La relation endophytique-hôte est un continuum symbiotique équilibré. Les champignons colonisent les plantes surtout en s'y liant, mais dans certains cas, ils peuvent vivre à l'intérieur des plantes en pénétrant le cortex racinaire ou les parties aériennes des plantes grâce à leurs systèmes enzymatiques extracellulaires (Leitão et Enguita, 2016).

L'utilisation d'endophytes fongiques et de leurs **extrolites** peut être une excellente occasion de réduire au minimum les effets néfastes des facteurs abiotiques, comme la salinité (**Figure 1**). Celle-ci entraîne une réduction de la biomasse des racines en raison de l'inhibition de la division cellulaire induite par la salinité et affecte le rendement total de la biomasse. Une plante colonisée par des champignons endophytes améliore l'accumulation de la biomasse en modifiant l'architecture des racines et en augmentant l'absorption des nutriments. L'accumulation de sel crée une compétition pour l'absorption et le transport des nutriments. Il en résulte un déséquilibre de la composition ionique de la plante, ce qui affecte ses caractéristiques physiologiques. Les champignons endophytes améliorent l'expression des gènes et régulent à la hausse plusieurs transporteurs de cations, ce qui améliore l'absorption des nutriments et le maintien de l'homéostasie ionique. L'augmentation du sel dans le sol abaisse le potentiel hydrique du sol, ce qui entraîne une déshydratation cellulaire. Les champignons endophytes annulent cet effet en favorisant l'accumulation d'osmolytes, ce qui améliore l'état hydrique de la plante (Gupta *et al.*, 2021).



**Figure 1:** effets bénéfiques potentiels de la colonisation des racines des plantes par des champignons endophytes symbiotiques dans des conditions de sol salin (Gupta *et al.*, 2021).

## 5. Tolérance des mycoendophytes au stress abiotique

Les chercheurs ont démontré que certains mycoendophytes protègent leurs plantes hôtes contre la sécheresse (Clay *et al.*, 2002) et leur permettent également de tolérer le stress salin (Waller *et al.*, 2005), ainsi qu'augmenter la tolérance thermique chez leur hôte. Il est donc possible de dire que les endophytes agissent comme des déclencheurs biologiques pour activer la réponse au stress plus fortement et plus rapidement que les plantes non symbiotiques (Redman *et al.*, 2001).

## 6. Genre *Penicillium*

### 6.1. Définition

Le genre *Penicillium* est l'un des "mycofacteurs" les plus polyvalents, fait partie du phylum *Ascomycota* (Leitão et Enguita, 2016) Comprenant plus de 200 espèces (Toghueo et Boyom, 2020). Il est très fréquent dans le sol, dans les plantes pourrissantes et le compost, aussi bien qu'en bois, aliments secs, épices, céréales, fruits et légumes frais, il peut également être trouvé sur les matériaux de construction dans les environnements endommagés par l'eau. Se produit dans les plus fortes concentrations en automne et en hiver, bien qu'il se produit pendant toute l'année.

### 6.2. Conditions de croissance

Ce sont des champignons mésophiles qui peuvent se développer entre 5 et 37°C. La croissance optimale in vitro est à une température de 23°C, pH 3-4,5 et Aw = 0,78-0,88. <https://www.inspq.qc.ca/moisissures/fiches/penicillium-spp>.

### 6.3. Tolérance des endophytes du genre *Penicillium* au stress salin

La croissance fongique est influencée par plusieurs facteurs du système environnemental, notamment les concentrations en sel. Cette dernière restreint la croissance du mycélium fongique par les effets néfastes des sels et par la diminution de la disponibilité des glucides. La raison de la grande séparation du champignon dans différents milieux est sa sécrétion de multiples enzymes, qui lui permettent d'exploiter différentes sources d'aliments et de résister à des conditions environnementales variées (Waheed *et al.*, 2019). Le genre *Penicillium* tolère de fortes concentrations de sels et la majorité de ses espèces sont cultivées à une concentration de 20 % ou plus de NaCl (Waheed *et al.*, 2019).

Diverses espèces de *Penicillium* ont été signalées comme des endophytes (Leitão et Enguita, 2016), qui colonisent leurs niches écologiques et protègent leurs plantes hôtes de divers stress par plusieurs fonctions biologiques (Toghueo et Boyom, 2020). Les endophytes de *Penicillium* peuvent aider les plantes à reprogrammer leurs réponses au stress salin en modulant les hormones végétales endogènes et les enzymes pour minimiser la cytotoxicité (Leitão et Enguita, 2016).

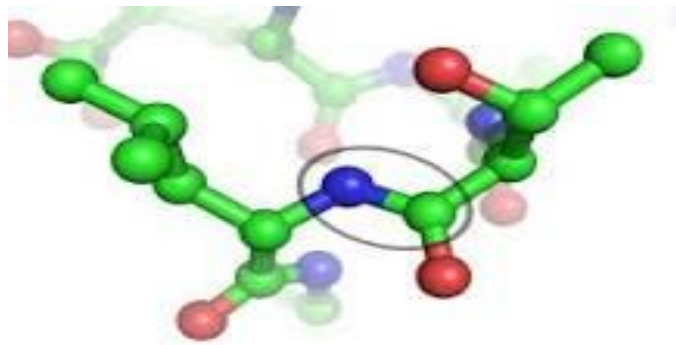


## 7. Protéases des champignons endophytes

### 7.1. Définition

Les protéases (peptidases ou enzymes protéolytiques) sont tous les enzymes qui catalysent le clivage des liaisons peptidiques (CONH) des protéines, digérant ces dernières en peptides ou en acides aminés (Souza *et al.*, 2015; Monod *et al.*, 2002) (**Figure 2**). Elles appartiennent à un grand groupe d'enzymes des hydrolases (Bezerra *et al.*, 2021).

La plupart des protéases naturelles sont initialement produites sous forme de précurseurs inactifs appelés zymogènes, certaines sont activées par des changements environnementaux pour induire des changements conformationnels ou générer des conformations actives ou par la liaison peptide/petite molécule (Li *et al.*, 2013).



**Figure 2:** liaisons peptidiques (entre un azote en bleu et un carbone en vert) hydrolysées par les protéases (<http://www.Futura-sciences.com>).

### 7.2. Propriétés

Les protéases sont un groupe très vaste et complexe d'enzymes qui diffèrent par le site actif, la spécificité du substrat, le mécanisme catalytique, le pH, la température optimale et les profils de stabilité (Jisha *et al.*, 2013).

La spécificité des enzymes protéolytiques dépend de la nature des acides aminés et des autres groupements fonctionnels (aromatiques ou aliphatiques ou soufrés) proches de la liaison à hydrolyser (Sumantha *et al.*, 2006).

Les protéases peuvent influencer sur les propriétés biologiques des chaînes de polypeptides. Elles peuvent influencer sur les propriétés biologiques des chaînes de polypeptides. Une protéolyse spécifique conduit souvent à l'activation ou à l'inactivation de protéines et de peptides, ainsi qu'à leur dégradation par une protéolyse non spécifique. Ces enzymes représentent donc un danger potentiel pour les cellules et peuvent modifier leur environnement (Wladyka et Pustelny, 2008).

### 7.3. Mode d'action

Le mode d'action des protéases diffère d'une enzyme à l'autre en fonction de la nature de leur site actif, bien que tous aient le même principe de base. Ce procédé de catalyse se résume en trois étapes :

Au cours des deux premières étapes, l'enzyme dénature la liaison peptidique et renforce la polarité du carbonyle ce qui facilite son attaque nucléophile entraînant la formation d'une liaison covalente passagère entre la pièce porteuse du substrat carbonyle et l'enzyme (le premier produit) protoné par un proton cédé d'un résidu enzymatique.

La troisième étape consiste à effectuer une nouvelle substitution nucléophile par l'OH- d'une molécule d'eau et à libérer le second produit de la réaction, où le site actif de l'enzyme est régénéré par un proton ( $H_2O$ ) (Dendouga, 2006).

### 7.4. Classification

#### 7.4.1. En fonction de leur site d'action

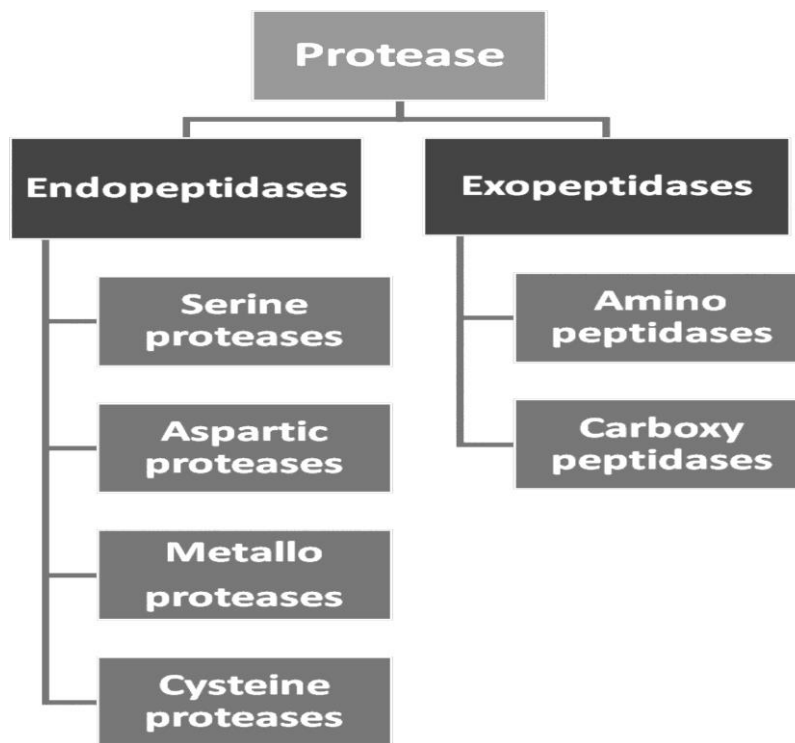
Les protéases sont généralement classées en deux groupes principaux, à savoir les endopeptidases et les exopeptidases (Mamo et Assefa, 2019) (**Figure 3**).

##### a) -Endoprotéases

Ce sont les protéases qui clivent les liaisons peptidiques éloignées des extrémités du substrat (clivent les liaisons peptidiques internes) (Mamo et Assefa, 2019), en fonction du résidu catalytique essentiel présent dans le site actif. Elles sont subdivisées en six groupes, à savoir la sérine, l'aspartique, cystéine, métallo, acide glutamique et thréonine protéases (Singh *et al.*, 2016).

## b) -Exoprotéases

Sont les protéases qui clivent la liaison peptidique à proximité des extrémités amino ou carboxy du substrat (clivent les liaisons peptidiques N- ou C-terminales d'une chaîne polypeptidique) (Mamo et Assefa, 2019). Les exopeptidases agissent sous deux formes, à savoir l'aminopeptidase et la carboxypeptidase (Gurumallesh *et al.*, 2019).



**Figure 3:** classification des protéases (Sharma *et al.*, 2019).

### 7.4.2. En fonction de leur pH optimal

Elles sont qualifiées d'acides, alcalines, ou neutres, c'est-à-dire les protéases acides : pH optimal inférieur à 7,0 (2,0-5,0), les protéases alcalines : pH optimal supérieur à 7,0 et les protéases neutres : pH optimal 7,0 (Sethi *et al.*, 2016).

## 8. Application biotechnologiques des protéases

Les protéases occupent une place importante dans les études actuelles et cela non seulement pour leur régulation des différents processus métabolique mais aussi leur utilisation

de plus en plus dans la fabrication de plusieurs produits industriels (Razzaq *et al.*, 2019) (Figure 4).

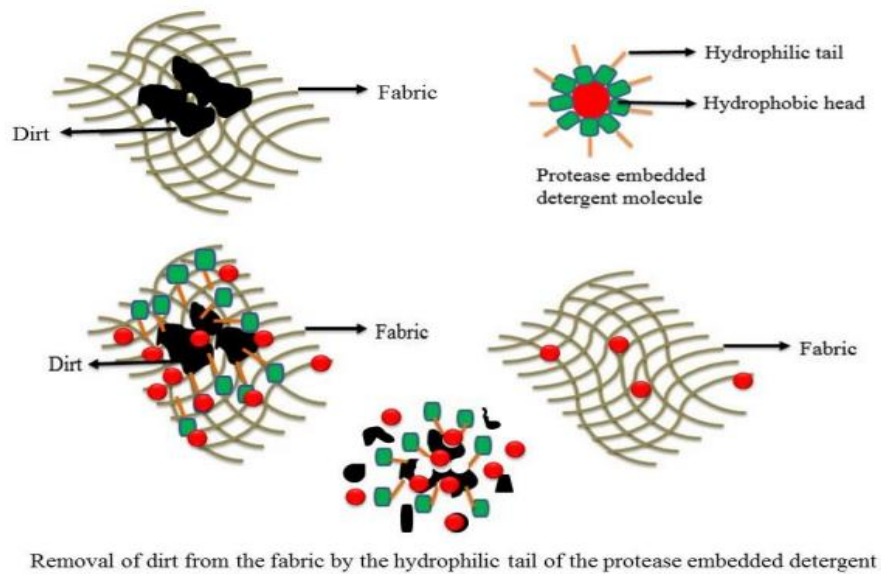


Figure 4: applications des protéases dans divers secteurs et industries (Solanki *et al.*, 2021).

### 8.1. Application dans l'industrie des détergents

Les protéases font partie des ingrédients standard de tous les types de détergents, de celles utilisées pour laver les vêtements à celles utilisées pour nettoyer les lentilles de contact ou les prothèses dentaires (Pratush *et al.*, 2013). Elles sont largement exploitées pour éliminer l'amidon et les salissures protéiques. (Gurumallesh *et al.*, 2019) (Figure 5).

La protéase idéale d'un détergent présente une grande spécificité de substrat afin de faciliter l'élimination d'une grande variété de taches (produits alimentaires, sang, herbe et sécrétions du corps) (Singh, 2016).



**Figure 5:** élimination des taches par une molécule détergente intégrée à une protéase (Gurumallesh *et al.*, 2019).

## 8.2. Application dans l'industrie du cuir

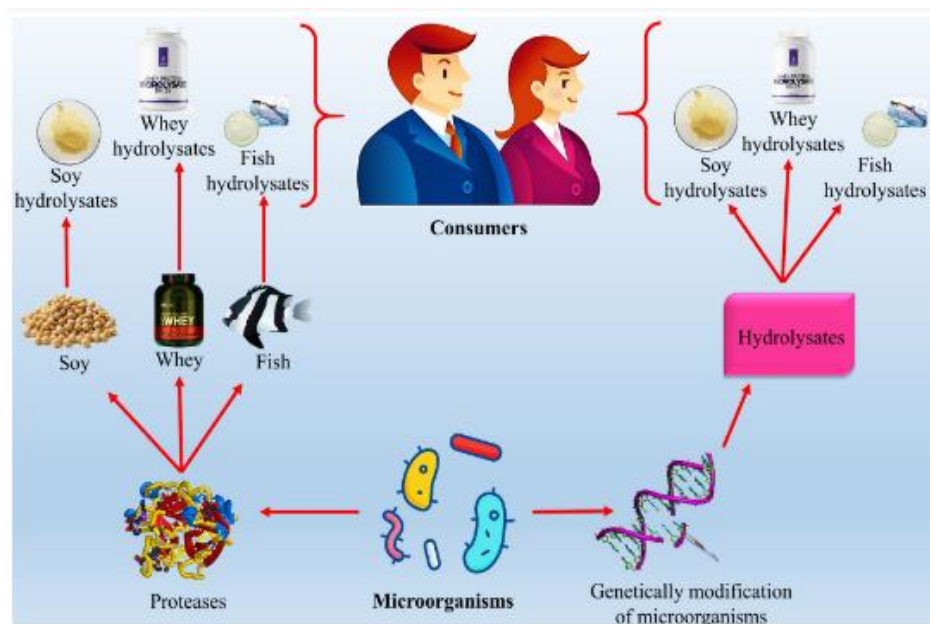
L'industrie du cuir consomme une grande quantité de protéases pour traiter le cuir brut, les protéases alcalines hydrolysent les composants non collagéniques de la peau et éliminent également les protéines non fibrillaires. Elles sont très utiles pour l'épilation (Banerjee *et al.*, 2017) et pour permettre une absorption plus rapide de l'eau, ce qui réduit la durée de trempage (Singh *et al.*, 2016). L'application de protéases alcalines en combinaison avec de la chaux hydratée et du chlorure de sodium au cours de l'épilation et du pâturage réduit l'évacuation des déchets (Singh *et al.*, 2016).

## 8.3. Application dans l'industrie alimentaire

Les protéases sont exploitées dans l'industrie alimentaire pour un large éventail d'applications (**Figure 6**). Ces enzymes contribuent efficacement à modifier les protéines alimentaires afin d'améliorer le goût, la valeur nutritive, la digestibilité, l'appétence et de réduire les composés allergéniques. Outre leur fonction de base, elles sont exploitées pour modifier les propriétés fonctionnelles, telles que le moussage, l'émulsification, la coagulation, la force du gel, la liaison etc. des protéines alimentaires (Singh *et al.*, 2016).

Dans l'industrie laitière, les protéases sont utilisées dans la fabrication du fromage pour hydrolyser des liaisons peptidiques spécifiques afin d'hydrolyser la caséine et reproduire des macropeptides (Singh *et al.*, 2016). Depuis des milliers d'années, les protéases servent à la coagulation du lait, qui constitue la principale étape de la production fromagère (Alavi et Momen, 2020).

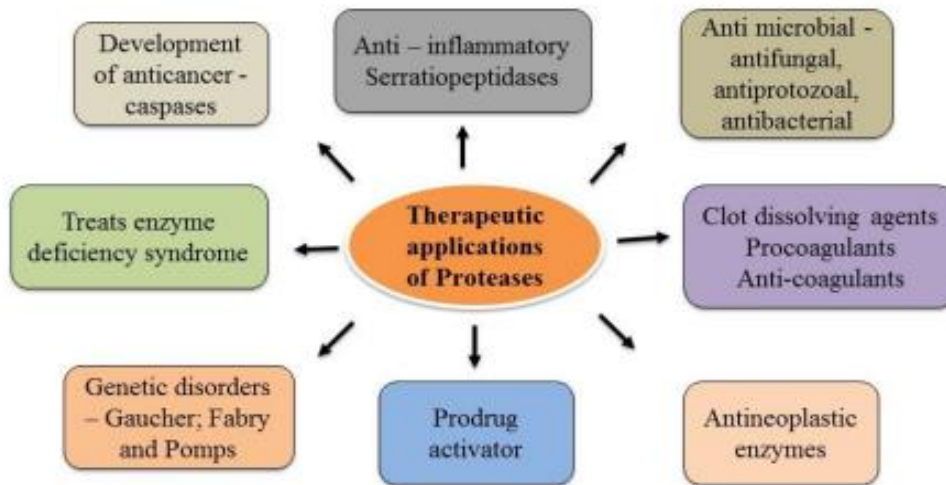
Dans l'industrie de la boulangerie, elles sont utilisées pour créer une pâte uniforme et réduire sa consistance, pour améliorer la texture et la saveur du pain et maintenir la force du gluten dans le pain (Singh *et al.*, 2016).



**Figure 6:** application des protéases fongiques dans l'industrie alimentaire (Naeem *et al.*, 2022).

#### 8.4. Application thérapeutique et pharmaceutique

Depuis de nombreuses années la protéase ainsi que plusieurs enzymes sont utilisées pour le diagnostic et le traitement en médecine. Les protéases sont participées au développement d'agents antimicrobiens, anticancéreux, anti-inflammatoires et de dissolvant les caillots (**Figure 7**) (Srilakshmi *et al.*, 2015). Sont également exploitées dans la dégradation de la kératinisée et la préparation de vaccins pour le traitement de la dermatophytose. En médecine traumatologique, sont appliquées pour éliminer les cicatrices, régénérer l'épithélium et accélérer les processus de guérison (Singh *et al.*, 2016).



**Figure 7:** application thérapeutique globale des protéases (Gurumallesh *et al.*, 2019).

### 8.5. Application dans l'industrie textile

Un autre domaine important d'application commerciale de la protéase est l'industrie textile où des textures finales élégantes sont obtenues par traitement enzymatique. La soie est le tissu le plus précieux utilisé pour de nombreuses applications et est traitée avec des protéases pour éliminer la gomme et les autres impuretés présentes dans les fibres protéiques centrales de la soie (Srilakshmi *et al.*, 2015).

### 8.6. Autres applications

Les protéases peuvent aussi être utilisées en tant qu'agents de lutte biologique pour les nématodes pathogènes. Elles sont des agents de lutte biologique naturels qui offrent plusieurs avantages tels que la non-toxicité, le respect de l'environnement, la durabilité économique, de même que l'amélioration des caractéristiques du sol et de la croissance des plantes (Solanki *et al.*, 2021). Il a été signalé que les protéases ont une excellente activité gélatinolytique pour la récupération de l'argent à partir de films radiographiques (Solanki *et al.*, 2021). Leur clivage sélectif des liaisons peptidiques est utilisé dans l'élucidation de la relation structure-fonction, dans la synthèse des peptides et le séquençage des protéines (Jisha *et al.*, 2013).

# **Matériel et méthodes**



## 1. Objectif du travail

Le présent travail est réalisé au niveau du laboratoire de Génies Microbiologiques et Applications et Laboratoire de Biologie et Environnement (LBE) à Chaabt Erassas, pendant la période allant du mois de **Mars au mois de Mai**.

Il porte sur la mise en évidence de l'activité protéolytique et l'extraction des protéases extracellulaires et endocellulaires produites par le genre fongique *Penicillium sp.* cultivé sur le milieu gélatine à des différentes concentrations de NaCl.

## 2. Matériel biologique

*Penicillium sp.* provient de la collection du laboratoire de Biologie et Environnement de l'université frères Mentouri Constantine 1. Il était isolé des racines d'une plante hyperaccumulatrice des métaux lourds, *Hedysarum Pallidum Desf*; poussant sur des déblais de mines de la région d'Ain Babouche de la wilaya d'Oum Elbouaghi.

### 2.1. Réactivation de la souche fongique

La souche fongique est réactivée sur milieu PDA à l'aide d'une anse de platine stérile, un fragment mycélien est gratté et déposé au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu précédemment cité (**Annexe 1**), les boîtes sont incubées à 30°C pendant 6 jours dans une étuve (MEMMERT).

### 2.2. Examen Macroscopique

L'identification macroscopique de la souche est effectuée par un examen à l'œil nu, qui permet de mettre en évidence les différents aspects morphologiques.

### 2.3. Examen Microscopique

L'identification microscopique de la souche fongique est réalisée par la méthode du ruban adhésif (Chabasse *et al.*, 2002). À l'aide d'une pince stérile, un petit morceau de ruban adhésif est appliqué par la face collante sur la colonie, puis déposé sur une lame qui contient une goutte de lactophénole bleu. La lame est déposée sous microscope optique (Leica). La mise en évidence est faite à l'aide de l'objectif \*10 et l'observation finale à l'aide de l'objectif \*40.

### 3. Mise en évidence de l'activité protéolytique sur milieu solide

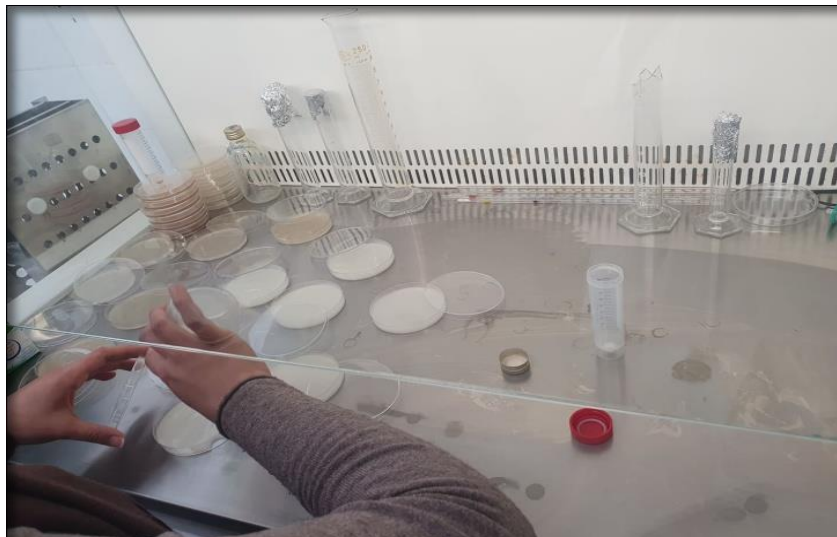
#### 3.1. Préparation des milieux

La mise en évidence de l'activité protéolytique est réalisée sur un milieu de l'agar blanc (**Annexe 1**), additionné de 5% de NaCl.

La stérilisation des milieux est réalisée par l'autoclavage (Adolf Wolf autoclave SANOclav) à 121° et sous pression 1 bar pendant 20 minutes.

#### 3.2. Préparation des protéines

Quatre protéines sont utilisées comme substrats à savoir : la caséine, la *Bovine serum albumin* (BSA), l'hémoglobine et l'albumine, chaque protéine est préparée séparément à une concentration de 1%. La stérilisation des solutions protéiques est effectuée par la méthode de tyndallisation pendant 3 jours (3 cycles). Les protéines préparées ont été ajoutés à l'agar blanc, d'une façon stérile (**Figure 8**).



**Figure 8:** photo prise de la préparation des protéines et le milieu de culture agar blanc sous la hotte.

### 3.3. Ensemencement

Après solidification du milieu, un fragment mycélien a été déposé au centre de la boîte contenant une des protéines en absence de sel (0%) et en présence de sel (5%). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 4 jours.

## 4. Fermentation submergé

### 4.1. Préparation des milieux de fermentation

La fermentation est réalisée sur un milieu gélatiné (**Annexe 1**), 500 mL de milieu additionné de 5% de NaCl. Trois répétitions sont effectuées pour chaque concentration (0% et 5% de NaCl).

### 4.2. Inoculation

Chaque flacon a été inoculé par 4 disques mycéliens de 5 mm de diamètre, puis incubés pendant six jours avec agitation orbitale (175 rpm) à 28° C à l'aide d'un agitateur-incubateur (New Brunswick Scientific) (**Figure 9**).



**Figure 9:** incubation des milieux de fermentation à 0% et 5% de NaCl.

## 5. Mesure de l'activité protéolytique

### 5.1. Extrait enzymatique exocellulaire

Après la fermentation, les cultures submergées des différentes concentrations (0% et 5%) en NaCl sont filtrées à l'aide d'un papier-filtre (Whatman N°01). Les filtrats obtenus constituent les extraits exocellulaires. Ces derniers sont conservés au congélateur pour le dosage des protéines et de l'activité enzymatique.

### 5.2. Extrait enzymatique endocellulaire

Les biomasses récupérées après filtration sont séchées sous la hotte (FlowFAST V). Chacune est pesée à l'aide d'une balance de précision (KERN) afin d'estimer la croissance.

0,5 g des biomasses sont broyées sous l'azote liquide (**Figure 10**). Les protéines sont ensuite extraites à 4°C avec 5 mL du tampon phosphate de potassium 50mM à froid (pH 7,0) contenant 0.1% de triton x-100 (v/v) et 1% Polyvinylpyrrolidone (PVP) (w/v) (Meghnous et al., 2019).



**Figure 10:** broyage de la biomasse.

Les extraits sont récupérés dans des tubes secs et stériles de 5mL, puis centrifugés à 4° pendant 20 minutes (SIGMA) à 14000\*g. Les surnageants constituent les extraits endocellulaires et servent pour le dosage des protéines et de l'activité enzymatique.

## 6. Dosage des protéines

La quantité de protéines contenue dans les extraits est estimée selon la méthode colorimétrique de Lowry *et al.* (1951) où la BSA (**Annexe 5**) est utilisée comme standard.

Ajouter 1mL de **solution M (Annexe 2)** à 0,2 mL de chaque extrait enzymatique endocellulaire et exocellulaire des différentes concentrations de 0% et 5% de NaCl, puis ajouter 0,2 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (**Annexe 3**) et bien homogénéiser au vortex (VWR). Laisser reposer 45 min à température ambiante, à l'obscurité avant de mesurer l'absorbance à 750 nm.

## 7. Dosage de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique a été réalisée selon la méthode modifiée de Mechakra *et al.* (1999), en utilisant la caséine, la BSA, l'hémoglobine et l'albumine comme substrats.

### 7.1. Préparation des solutions protéiques

Pour chaque solution protéique nous mettons 2,5% de protéine (la caséine, la BSA, l'hémoglobine et l'albumine) dans 100mL de tampon citrate phosphate 0,2 M à pH 6,8 et le pH est ajusté à pH 6,8.

### 7.2 Protocole de dosage

#### 7.2.1 Première étape

Le mélange réactionnel est préparé comme suit :

- 1,5 mL de solution de tampon citrate phosphate 0,2 M, pH 6,8.
- Rajouter 1mL de l'extrait enzymatique endocellulaire et l'exocellulaire (l'extrait enzymatique exocellulaire décongelé juste avant le dosage).
- Enfin 2,5mL de substrats.

Après incubation pendant 1 heure au bain-marie (MEMMERT) à 40°C, la réaction est arrêtée par addition de 5mL de TCA à 4% (**Annexe 4**), ce qui entraîne la précipitation des macromolécules, y compris l'enzyme et les protéines non hydrolysées (**Figure 11**). Le blanc est préparé de la même manière sauf que le TCA est rajouté avant le substrat.



Figure 11: photo prise qui montre l'ajout du TCA pour arrêter la réaction enzymatique.

### 7.2.2 Deuxième étape

- 1- 0,5mL du filtrat de chaque protéine (la caséine, la BSA, l'hémoglobine et l'albumine) des différentes concentrations (0% et 5% de NaCl).
- 2- Ajouter 2,5mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 2% dans le NaOH (0,1N).
- 3- Enfin ajouter 0,25mL de réactif Folin-Ciocalteu dilué au 1/2ème. Les mélanges sont bien agités et laissés reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant 45 minutes.

L'absorbance de la coloration bleue développée est lue à 750 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Une courbe étalon de la tyrosine (**Annexe 5**) est utilisée comme standard afin de calculer l'activité protéolytique. L'activité enzymatique se traduit par unité internationale (UI) qui est définie par la concentration de tyrosine en  $\mu\text{g/mL}$  libérée par 1mL d'extrait enzymatique.

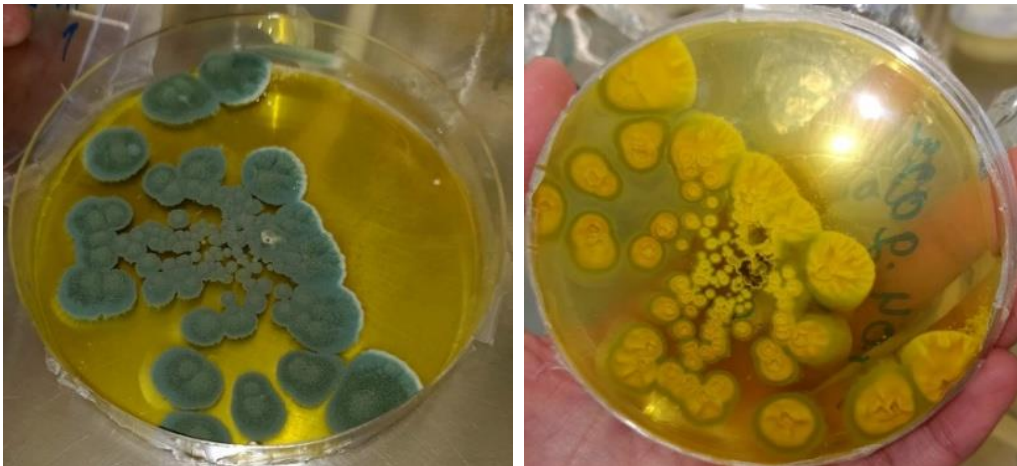
# **Résultats et discussion**

## 1. Identification de la souche fongique

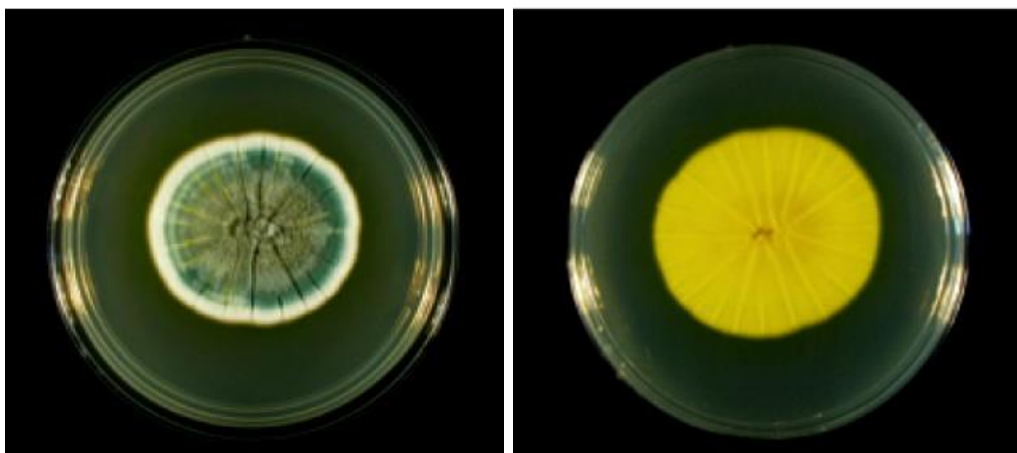
L'identification des espèces se fait sur la base de critères macroscopiques (aspect général de la colonie) et microscopiques (étude des filaments végétatifs, des organes fructifères et des spores). Quelques données (température et rapidité de la croissance) seront des compléments utiles à l'identification (Chabasse *et al.*, 2002).

### 1.1. Caractères macroscopiques

Après 6 jours d'incubation à 30°C sur milieu PDA, la description macroscopique des colonies de *Penicillium sp.* est faite (**Figure 12**). Les résultats observés sont présentés dans le **tableau 1**.



**Figure 12:** aspect macroscopique de *Penicillium sp.* après 6 jours d'incubation.



**Figure 13:** photo référenciée de la colonie *Penicillium sp.* (Chabasse *et al.*, 2002).



**Tableau 1:** caractères culturels des colonies de *Penicillium sp.*

Milieu	Colonie	Texture de Surface	Couleur		Conteur	Taille
			Surface	Revers		
PDA	Ronde	Poudreuse	Vert pâle	Jaune	Blanc et irrégulier	Colonies moyennes dont le diamètre est compris entre 1.3 à 1.5 cm

### 1.2. Caractères microscopiques

L'observation microscopique de la souche fongique a été effectuée sous microscope optique grossissement \*40 (**Figure 13**). Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 2**.

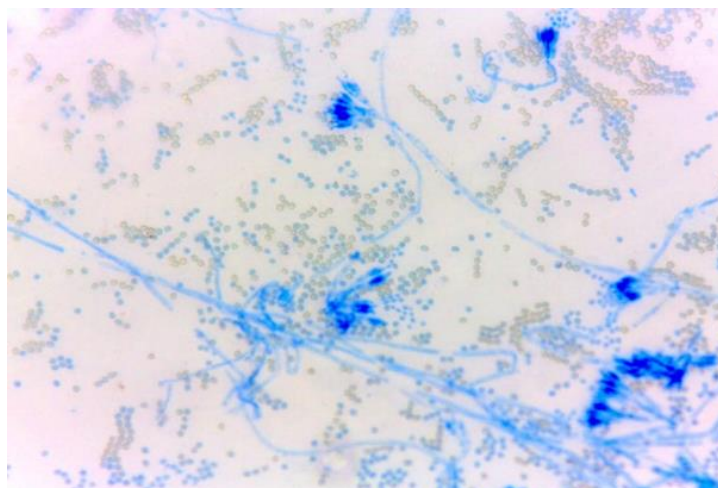


Figure 14: aspect microscopique de *Penicillium sp.* au grossissement \*40.

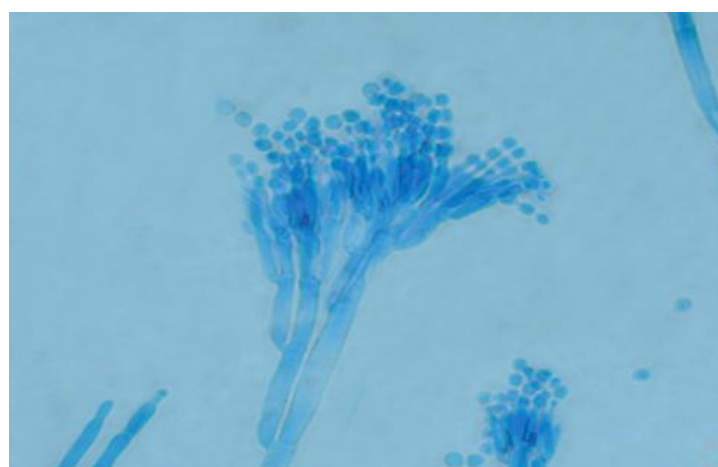


Figure 15: photo référenciée de l'aspect microscopique de *Penicillium sp.* (Chabasse *et al.*, 2002).

**Tableau 2:** caractères microscopiques des colonies de *Penicillium sp.*.

Caractère	Hyphe	Conidiophores	Phialides	Spores	Conidies
Description	Septé	Ramifiés (regroupés en buisson)	Disposés en verticilles (forme de pinceau (pénicille))	Disposées en chaînes (chaînes basipètes non ramifiées)	Rondes à ovoïdes, pigmentées et échinulées

Les résultats de l'identification macroscopique et microscopique se concordent avec ceux de (Chabasse *et al.*, 2002) (**Figure 14** et **Figure 15**), qui confirment que notre souche fongique est *Penicillium sp.* .

## 2. Mise en évidence de l'activité protéolytique

Les résultats obtenus après 4 jours d'incubation à 30°C sur l'agar blanc additionné de protéines et de NaCl, sont présentés dans le **tableau 3**, ils montrent que la souche *Penicillium sp.* présente une activité protéolytique à des concentrations de 0% et 5% de NaCl, qui se traduit par l'apparition des zones de lyse autour des biomasses fongiques (**Annexe 6**), correspondant à l'hydrolyse des protéines (la caséine, la BSA, l'hémoglobine et l'albumine).

**Tableau 3:** diamètres des zones de lyse de *Penicillium sp.* à 0% et 5% de NaCl.

		Caséine	BSA	Hémoglobine	Albumine
<b>0% NaCl</b>	<b>Diamètre (mm)</b>	54mm	30,4mm	41,8mm	17,1mm
<b>5% NaCl</b>	<b>Diamètre (mm)</b>	23,5mm	40,3mm	21mm	15,3mm

Il est tout de même à noter que *Penicillium sp.* répondant positivement au test de la mise en évidence d'activité protéolytique à deux différentes concentrations en NaCl (0% et 5%), la plus grande zone d'hydrolyse des protéines à 0% de NaCl observée en présence de la caséine avec une zone de lyse de 54mm de diamètre. Par contre à 5%, elle est observée en présence de la BSA avec une zone de lyse de 40,3mm de diamètre.

Les travaux de Boucherit *et al.* (2022) sur *Penicillium sp.* cultivé sur le milieu de l'agar montrent qu'une zone dégagée autour de la colonie représente un résultat positif et l'activité recherchée est associée à la dégradation des protéines.

Ces résultats démontrent clairement que la souche fongique a la capacité d'hydrolyser les protéines (la caséine, la BSA, l'hémoglobine et l'albumine) **même dans un milieu salin (5% de NaCl)**.

### 3. Effet de NaCl sur la croissance de *Penicillium sp.* en milieu liquide

Après 6 jours de fermentation dans un milieu liquide de gélatine, la biomasse est pesée pour les deux concentrations en NaCl (0% et 5%). Les résultats sont résumés dans le **tableau 4**.

**Tableau 4:** poids des biomasses à des différentes concentrations 0% et 5% de NaCl.

Concentration de NaCl	Poids des biomasses
0% NaCl	0,74g
5% NaCl	0,32g

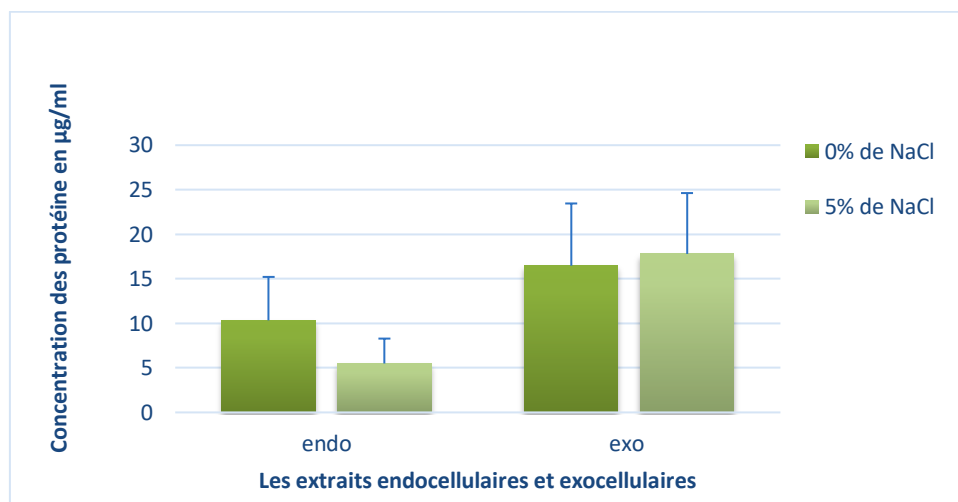
Selon les résultats du **tableau 4** nous avons constaté que le poids de la biomasse à 0% de NaCl est plus important que celui à 5%, cela veut dire que la présence du NaCl a réduit de moitié la prolifération du champignon.

Ces résultats se concordent avec les résultats d'Al Tamie, (2014), qui a indiqué que le taux de croissance élevé de *Penicillium sp.* a été observé à de faibles concentrations de sel. Tandis que des concentrations élevées (5%, 10%, 15%, 20%) de sel ont réduit la croissance fongique. De plus ces résultats sont cohérents avec ceux de Yan N *et al.* (2015) ont confirmé qu'en présence du sel il y'a une diminution de la biomasse.

## 4. Effet de NaCl sur l'activité protéolytique de *Penicillium sp.* en milieu liquide

### 4.1. Protéines

Les résultats portés dans la **Figure 16** résument le taux des protéines des extraits en présence et en absence de sel.



**Figure 16:** concentrations des protéines des extraits endocellulaires et exocellulaires à 0% et 5% de NaCl.

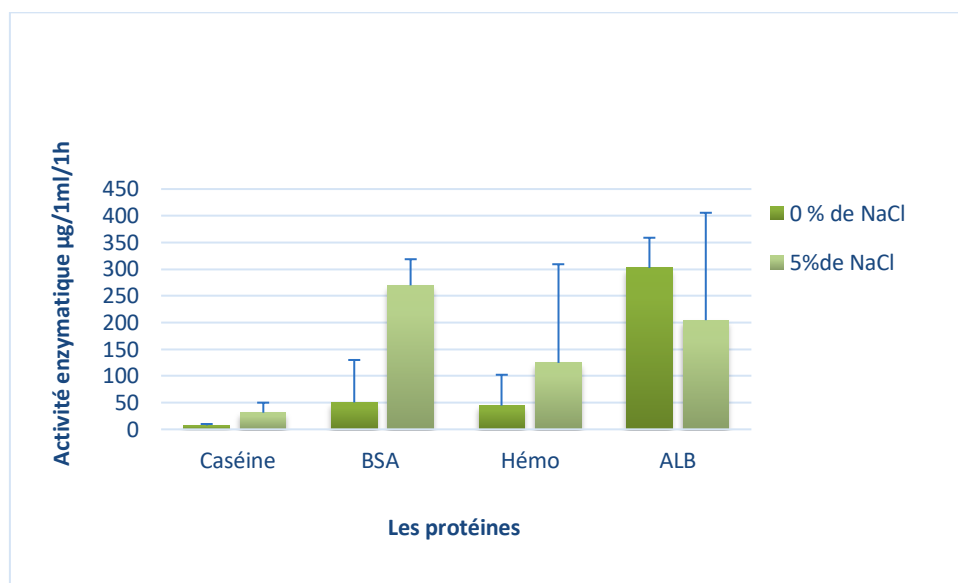
Cet histogramme montre que la concentration des protéines endocellulaires à 0% de NaCl est de 10,33µg/mL, elle est passée à 5,49µg/mL pour la concentration de 5% de NaCl. Cela est dû à l'adaptation de *Penicillium sp.* au nouveau milieu qui contient le sel.

La concentration des protéines exocellulaires à 5% de NaCl est de 17,79 µg/ml, par contre elle est 16,47 µg/ml à 0%. Cela confirme que la souche fongique a sécrété une quantité importante d'enzymes pour s'adapter au milieu salin.

Les enzymes des extrêmophiles présentent une variété de propriétés utiles, notamment la tolérance et l'adaptation à la salinité (Chung *et al.*, 2022). La raison du grand isolement des champignons dans différents milieux et qu'ils sécrètent de multiples enzymes qui leur permettent de résister à diverses conditions environnementales (Waheed *et al.*, 2019). La croissance en haute salinité nécessite une adaptation au métabolisme cellulaire (Al Tamie, 2016).

### 4.3. Activité enzymatique

Suite à un consensus scientifique, l'activité enzymatique s'exprime en 1UI = 1µg de tyrosine libérée par 1mL d'enzyme par 1heure. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures ci-dessous (**Figure 19** et **Figure 20**).



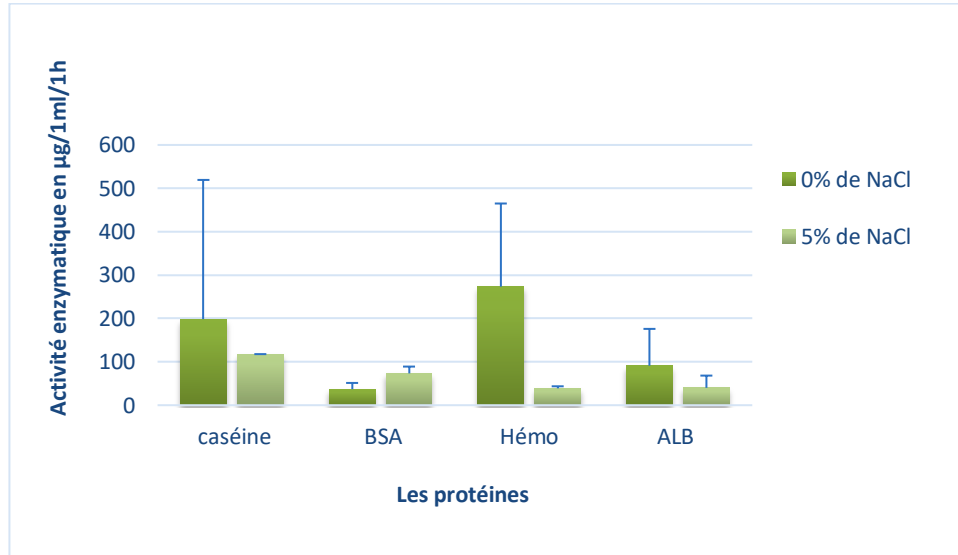
**Figure 17:** activité enzymatique endocellulaire en présence de quatre substrats à 0% et 5% de NaCl.

D'après la figure 19, la plus importante activité enzymatique endocellulaire à 5% de NaCl est obtenue en présence de la BSA, elle est de 269,62 UI, suivie de celle de l'albumine qui est de 204,44UI, suivie de celle de l'hémoglobine qui est de 124,44UI, puis celle de la caséine qui est de 31,11UI.

Les plus faibles activités à 0% de NaCl sont observées chez la caséine, hémoglobine et la BSA (7,40UI ; 44,44UI ; 50,37UI) respectivement. Par contre, l'activité enzymatique endocellulaire de l'albumine à 0% de NaCl est de 302,22 UI, elle est plus importante qu'à 5% qui est de 204,44 UI.

Ces résultats montrent qu'en milieu salin (5% de NaCl), la souche fongique est adaptée et à commencer à sécréter des enzymes endocellulaires pour dégrader les protéines induit par ce stress.

Plusieurs résultats rapportent l'isolement de souches de *Penicillium sp.* qui présentent une tolérance au sel allant jusqu'à 22 % de NaCl (Boucherit *et al.*, 2022).



**Figure 18:** activité enzymatique exocellulaire en présence de quatre substrats à 0% et 5% de NaCl.

D'après la figure 20, la plus importante activité enzymatique exocellulaire à 0% de NaCl est obtenue en présence de l'hémoglobine, elle est de 273,33 UI, suivie de celle de la caséine qui est de 198,51UI, suivie de celle de l'albumine qui est de 91,11UI puis celle de la BSA qui est de 37.03UI.

Les plus faibles activités sont celles observées à 5% de NaCl en présence de la BSA suivie de l'albumine et de l'hémoglobine qui sont de (73,33UI ; 40UI ; 38,88UI) respectivement. À l'inverse, l'activité enzymatique de la caséine qui est à 5% de NaCl est de 117,77UI, il y'a une augmentation des protéases qui dégradent cette protéine.

Cela confirme que notre souche fongique est productrice d'enzymes exocellulaires dans un milieu salin.

Selon les travaux de Boucherit *et al.* (2022), sur *Penicillium chrysogenum* cultivé en présence du sel allant de 22% NaCl, montrent que cette souche a la capacité de produire des enzymes extracellulaires. Les champignons comme *Penicillium sp.* sont considérés comme des producteurs passionnants d'enzymes extracellulaires en raison de leur large gamme de substrats acceptables (Boucherit *et al.*, 2022).

# **Conclusion**

La pollution des sols est l'une des facteurs défavorables qui créent des stress abiotiques, parmi ces stress la salinité. Cette dernière est définie comme l'accumulation excessive de sels hydrosolubles, en règle générale, il s'agit de NaCl. Elle a un impact négatif sur le développement des plantes. De nombreuses études récentes portent sur les champignons endophytes qui constituent un important réservoir d'enzymes protéolytiques qui sont essentielles dans l'adaptation et la survie des plantes et représentent l'un des plus grands groupes d'enzyme industriel.

Le présent travail a concerné l'identification de souche fongique, l'extraction et le dosage des enzymes protéolytiques mettant en évidence l'effet de NaCl de deux concentrations (0% et 5%). L'identification de la souche fongique a été effectuée selon les caractères morphologiques, macroscopiques et microscopiques. Cette dernière a été soumise à une culture sur milieu solide pour la mise en évidence de l'activité protéolytique et une fermentation submergée afin d'extraire des protéases endocellulaires et exocellulaires et de doser leurs activités.

Les résultats ont permis de déduire que la souche est *Penicillium sp.* c'est une souche tolérante de la salinité (5% de NaCl), et elle a la capacité de produire des protéases endocellulaires et exocellulaires qui dégradent quatre substrats protéiques à savoir la caséine, la BSA, l'hémoglobine et l'albumine, dont l'activité enzymatique endocellulaire la plus importante est enregistrée à 5% de NaCl et celle de la BSA qui est de 269,62 UI, et l'exocellulaire est celle de la caséine qui est de 117,77UI..

Afin de poursuivre ce travail et à partir des résultats obtenus, il serait utile de mettre en **perspective** les points suivants :

- ❖ Augmenter les pourcentages de la salinité.
- ❖ Purification des protéases.
- ❖ L'optimisation de la culture.
- ❖ Rechercher des nouvelles espèces de *Penicillium* qui tolèrent des taux élevés de salinité.



- ❖ Effectuer une cinétique enzymatique pour déterminer les paramètres cinétiques de chaque enzyme (la constante de Michaelis « Km » et la vitesse maximale « Vmax ») et étudier la stabilité des enzymes en milieu salin à des fins industrielles.

# **Références bibliographiques**

- Al Tamie M.S.S. (2014).** Effect of salinity on the fungal occurrence in Al - Shefa Area at Al Qassim Saudi Arabia. *Research Journal of Microbiology*, 9(6), 287-295.
- Al Tamie M.S.S. (2016).** Sodium chloride stress induced morphological changes in some halotolerant fungi. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 62, 109-126.
- Alavi F and Momen S. (2020).** Aspartic proteases from thistle flowers: Traditional coagulants used in the modern cheese industry. *International Dairy Journal*, 107.
- Boucherit Z., Flahaut S., Djoudi B., Mouas T.N., Mecharka A and Ameddah S. (2022).** Potential of halophilic *Penicillium chrysogenum* isolated from Algerian saline soil to produce laccase on olive oil wastes. *Current Microbiology*, 79(178), 1-10.
- Bagheri A.A., Saadatmand S., Niknam V., Nejadstari T., Babaeizad V. (2013).** Effect of endophytic fungus, *Piriformospora indica*, on growth and activity of antioxidant enzymes of rice (*Oryza sativa L.*) under salinity stress. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 1(11), 1337-1350.
- Banerjee G and Ray A.k. (2017).** Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33(2).
- Baron N.C and Rigobelo E.C. (2022).** Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture, *Mycology, An International Journal on Fungal Biology*, 13(1), 39-55.
- Ben yahmed J. (2013).** Etude des propriétés de tolérance au déficit hydrique et au stress salin de géotypes appartenant au genre *Poncirus* et au groupe des mandariniers. Thèse de doctorat : Biologie Intégrative des Plantes. Centre international d'études supérieures en sciences agronomiques. Montpellier: Montpellier SIBAGH, 210p.
- Bezerra V.H.S., Cardoso S.L., Bazzo Y.F., Silveira D., Magalhães P.O and Souza P.M.** Protease produced by endophytic fungi: A Systematic Review. *Molecules*, 26(22), 7062.
- Biteur N. (2012).** Essais d'utilisation du radis (*Raphanus sativus*) dans la Phytoremédiation (Biodépollution) au niveau du sol Contaminé Par Les Métaux Lourds (Plomb) : Etude du stress oxydatif et quelques paramètres enzymatiques. Thèse De Doctorat : Biochimie Appliquée : Université D'es-Seniaoran-Oran, 110 p.
- Çam S and Küçük K. (2020).** The Effect of salinity on growth, antagonistic potential, protease activity and proline content of *Trichoderma harzianu*. *Commagene Journal of Biology*, 4(1), 62-66.

- Chabasse D., Bouchra J – P., Degentdl L., Brun S., Cimon B and Penn P. (2002).** Les moisissures d'intérêt médical. Paris : bioforma Ed. Paris. Cahier de formation N ° 25 biologie médical.
- Chaudhary S., Shankar A., Singh A and Prasad V. (2017).** New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: Penicillium system properties and applications. **Gupta V.K and Rodriguez-Couto S. 277.**
- Chérifi k., Anagri A., Boufous E and El Mousadik A. (2017).** Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la croissance de six espèces d'Acaci. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 4(4), 105-113.
- Chowdhary P., Raj A., Verma A et al.** Microorganisms for sustainable environment and health. India: Lena Sparks, 492p.
- Chung D., Yu W.J., Lim J.Y., Kang N.S., Kwon Y.M., Choi G., Bae S.S., Cho K and Lee D.S. (2022).** Characterization of the proteolytic activity of a halophilic *Aspergillus reticulatus* strain SK1-1 isolated from a solar saltern. *Microorganisms*, 10(1), 29.
- Clay K and Shardi C. (2002).** Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist*, 4(4), 99-127.
- Dendouga W. (2006).** Isolement et identification de moisissures productrices de protéases à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite. Mémoire de Magister : Biochimie-Microbiologie appliquées. Constantine: Université Mentouri Constantine, 84p. <https://doi.org/10.1101/2021.12.02.470908>.
- Dubey R.S and Rani M. (1990).** Influence of salinity on the behavior of protease. aminopeptidase and carboxypeptidase in rice seedlings in relation to salt tolerance, *Australian Journal of Plant Physiology*, 17(2), 215-221.
- El-Iklil Y., Karrou M., Mrabet R. and Benichou M. (2002).** Salt stress effect on metabolite concentrations of *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon sheesmanii*. *Canadian Journal of Plant Science*, 82(1), 177–183.
- Gouda S., Das G., Sen S.K., Shin H.S., and Patra J.K. (2016).** Endophytes: A treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1538.
- Gupta S., Schillaci M., Walker R., Smith P.M.C., Watt M and Roessner U. (2020).** Alleviation of salinity stress in plants by endophytic plant-fungal symbiosis: Current knowledge, perspectives and future directions. *Plant Soil*, 461, 219-244.
- Gurumalles P., Alagu K., Ramakrishnan B and Muthusamy S. (2019).** A systematic reconsideration on proteases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128.

- Hopkins W.G. (2003).** Physiologie végétale. 2 éd. De boeck. Serge ambour révision scientifique de Charles-Marie Evradr Boeck univ. 514 p.
- Isayenkov S.V and Maathuis F.J.M.(2019).** Plant salinity stress: Many unanswered questions remain. *Frontiers in Plant Science*.
- Jabnour 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.
- Jisha V.N., B. Smitha R.B., Pradeep S., Sreedevi S., Unni K.N., Sajith S., Priji P., Josh M S and Benjamin S. (2013).** Versatility of microbial proteases. *Advances in Enzyme Research*, 1(3), 39-51.
- Kaur T. (2020).** Fungal endophyte-host plant interactions: Role in sustainable agriculture. Inde: **Hasanuzzaman M., Filho M.C.M.T., Fujita M and Nogurira T.A.R.** 2-3.
- Khan A., Khan A.L., Muneer S., Yoon-Ha Kim., Al-Rawahi A., and Al-Harrasi A. (2019).** Silicon and salinity: Crosstalk in crop-mediated stress tolerance mechanisms. *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01429>
- Leitão A.L and Enguita F.J. (2016).** Gibberellins in *Penicillium* strains: Challenges for endophyte-plant host interactions under salinity stress. *Microbiological Research*, 183, 8-18.
- Li Q., Yi L., Marek P and Iverson L.B. (2013).** Commercial proteases: Present and future. *FEBS Letters*, 587(8), 1115-1163.
- Lowry O.H., Rosebough N., Farr A.L and Randall R. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Mamo J and Assefa F. (2019).** The role of microbial aspartic protease enzyme in food and beverage industries. *Journal of Food Quality*. <https://doi.org/10.1155/2018/7957269>.
- Massissilya H et Thininane H. (2017).** Activité amylolytique et protéolytique de certains chgampignons endophytes foliaires issus de l'ortie (*Urtica dioïca L.*). Mémoire de Master : Science biologiques. Tizi-Ouzou : Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 91p.
- Meghnous O., Dehimat L., Dumas P., Kassa-Laouar M., Mosbah F and Rached O. (2019).** Oxidative and antioxidative responses to antimony stress by endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* isolated from antimony accumulator *Hedysarum pallidum Desf.* *Biologia*, 74(12).
- Mechakra A., Auberger B., Remeuf F et Lenoir J. (1999).** Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sci Aliments*, 19, 663-675.

- Middleton N and Thomas D. (1997).** World atlas of desertification. London: Arnold. 182.
- Naeem M., Manzoor S., Abid M., Tareen M., Asad M., Mushtaq S., Ehsan N., Amna D., Xu B and Abu Hazafa. (2022).** Fungal proteases as emerging biocatalysts to meet the current challenges and recent developments in biomedical therapies: An updated review. *Journal of fungi*, 8(2), 109.
- Nanjundappa M., Manjunatha N., Li H., Sivasithamp A., Jones M.G.K., Edwards I., Wylie S.J and Agarrwal R. (2021).** Fungal endophytes from salt-adapted plants confer salt tolerance and promote growth in Wheat (*Triticum aestivum L.*) at early seedling stage.
- Nehela A. (2016).** Symbioses tellurique : Rôle de tolérance aux stress abiotique. Thèse de doctorat : Biotechnologie. Oran: université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, 172p.
- 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.
- Pratush A., Gupta A and Bhalla T.K. (2013).** Microbial proteases. Prospects and challenges. *Microbiology Application*. 30-48.
- Raghav D., Jyoti A., Siddiqui A.J., Saxena J. (2022).** Plant-associated endophytic fungi as potential bio-factories for extracellular enzymes: Progress, challenges and strain improvement with precision approaches. *Journal of Applied Microbiology*, 1-24.
- Razzaq A., Shamsi S., Ali A., Ali Q., Sajjad M., Malik A and Ashraf M. (2019).** Microbial proteases applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7 (110).
- Redman R.S., Dunigan D.D., Rodriguez R.J. (2001).** Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader?. *New Phytologiste*, 151(3), 705-716.
- Rodriguez R.J., Redman R.S and Henson J.M. (2003).** The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 9, 261-272.
- Sethi K.B., Jana A., Nanda K.P., Mohapatra P.K.D and Sahoo S.L. (2016).** Thermostable acidic protease production in *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using chickling vetch peels. *Journal of Taibah University for Science*, 10(4), 571-583.
- Sharma M., Gat Y., Arya S., Kumar V., Panghal A and Kumar A. (2019).** A review on microbial alkaline protease: An essential tool for various industrial approaches. *Industrial Biotechnology*, 15(3), 69-78.

- Silva S.G.M., Melo B.A., Santos M.T., Rios R.R.S., Sansto C.M.S., Junior K.A.L.R., Maranhão F.C.A., Santos T.M.C and Fraga A.B. (2022).** Endophytic fungi: plant benefits and biotechnological potential. *Research, society and development*, 11(4).
- Singh R., Mittal A., Kumar M and Mehta P K. (2016).** Microbial proteases in commercial applications. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*. 4(3), 365-374.
- Solanki P., Putatunda C., Kumar A., Bhatia R and Walia A. (2021).** Microbial proteases. ubiquitous enzymes with innumerable uses. 11(10), 428.
- Souza P.M., Bittencourt A.M.L., Caprara C.C., Freitas M., Almeida R.P.C., Silveira D., Fonseca Y.M., Filho E.X.F., Junior A.P and Magalhães P.O. (2015).** A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 337-346.
- Srilakshmi J., Madhavi J., Lavanya S and Ammani K. (2015).** Commercial potential of fungal protease: Past, present and future prospects. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 3(4), 218-234.
- Sumantha A., Larroche C and Pandey A. (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. *Food Technology and Biotechnology* , 44(2), 211-220.
- Toghueo R.M.K and Boyom .FF. (2020).** Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. *3 Biotech*,10(3), 107.
- Waghunde R.R., Shelake R.M., Pramanik D., Suthar H., Pandey P and Kim J.Y. (2021).** Microbiomes and plant health: Panoply and their applications. **Solanki M.K., Ansari R.A., Kashyap P.L and Kumari B.**
- Waheed A.A., Daham A.A., Kadhim E and Kamal J.A.K. (2019).** Concentrations effect of some salts on growth of *Aspergillus Niger* and *Penicillium Oxalicum.*, *Plant Archives*, 19(2), 310-312.
- Waller F., Achatz B., Baltruschat H., Fodor J., Becker K., Fischer M., Heier T., Huckelhoven R., Neumann C., Wettstein D.V., Franken P and Kogel K.H. (2005).** The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *PNAS*, 102(38). 13386-13391.
- Wladyka B and Pustelny K. (2008).** Regulation of bacterial protease activity. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 13(2), 2012-229.
- Yan N., Marschner P., Cao W., Zuo C and Qin W. (2015).** Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International Soil and Water Conservation Research*, 3(4), 316-323.

**Site webographie**

<http://www.Futura-sciences.com>

<https://www.inspq.qc.ca/moisissures/fiches/penicillium-spp>



# **Annexes**

## Annexe 1

### Les milieux de culture utilisés

#### ❖ Milieu PDA (composition en g/l pour 1L)

Pomme de terre.....	200g
Agar.....	20g
Glucose.....	20g
L'eau distillée.....	1L



#### ❖ Milieu gélatiné (composition en g/l pour 1L)(Massissilya et Thinhinane, 2017)

Gélatine.....	10g
Extrait de viande.....	1.5g
Peptone .....	5g
NaCl.....	5g
MgSO <sub>4</sub> .....	0.5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.5g
KCl.....	0.5g
L'eau distillée.....	1L

pH= 6.8

**❖ Milieu de l'agar blanc (composition en g/l pour 1L)**

Agar blanc.....	20g
Eau distillée.....	1L

**Annexe 2****Solution A (pour 100mL)**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	2g
NaOH.....	100mL

**Solution B (pour 100mL)**

CuSO <sub>4</sub> .....	1g
L'eau distillée.....	100mL

**Solution C (pour 100mL)**

Tartrate double de sodium.....	2mL
L'eau distillée .....	100mL

**Solution M (pour 150mL)**

Solution A.....	50mL
Solution B.....	50mL
Solution C.....	50mL

**Annexe 3****Le réactif Folin-Ciocalteu (pour 50mL)**

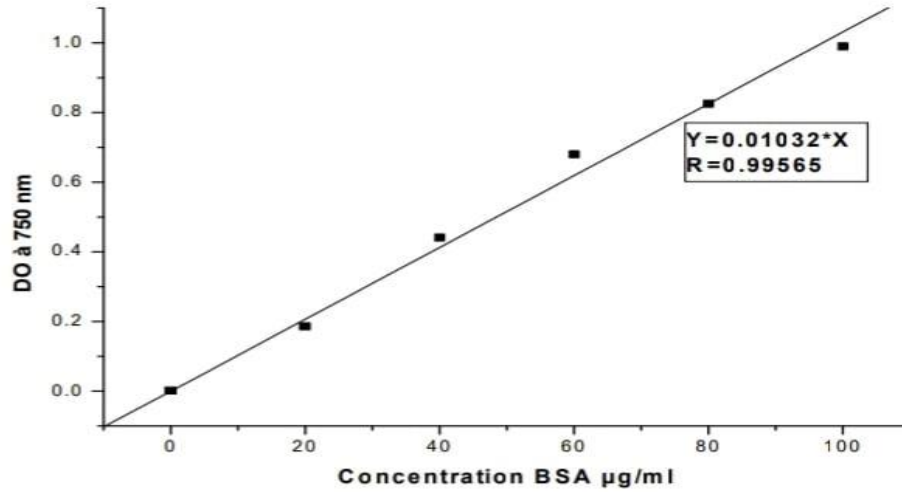
Folin.....	50g
Eau distillée.....	50mL

**Annexe 4****TCA pour (100mL)**

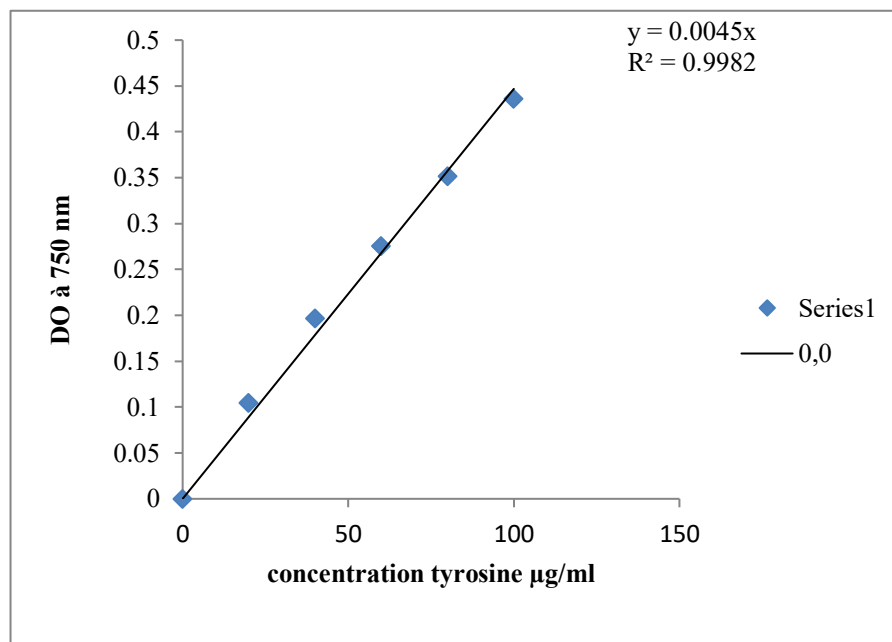
TCA.....	4g
Eau distillé.....	100mL

## Annexe 5

## Courbe d'étalonnage de la BSA


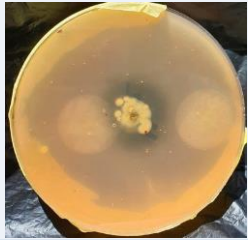




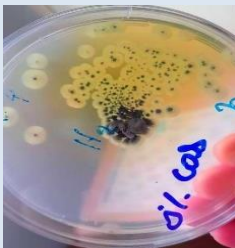



## Courbe d'étalonnage de la tyrosine


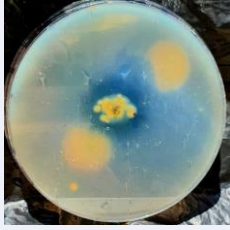








## Annexe 6









**Tableau 1** : résultats du test de la mise en évidence de l'activité protéolytique de *Penicillium* *sp.* sur milieu d'agar blanc à 0% NaCl.

La protéine	Aspect macroscopique	
	Surface	Revers
Hémoglobine		
BSA		
Albumine		
Caséine		







**Tableau 2** : résultats du test de la mise en évidence de l'activité protéolytique de *Penicillium* *sp.* sur milieu d'agar blanc à 0% NaCl colorée par *bleu de Coomassie*.

La protéine	Aspect macroscopique	
	Surface	Revers
Hémoglobine		
BSA		
Albumine		
Caséine		

**Tableau 3** : résultats du test de la mise en évidence de l'activité protéolytique de *Penicillium* sp. sur milieu d'agar blanc à 5% NaCl.

La protéine	L'aspect macroscopique	
	Surface	Revers
Hémoglobine		
BSA		
Albumine		
Caséine		

**Tableau 4** : résultats du test de la mise en évidence de l'activité protéolytique de *Penicillium* *sp.* sur milieu d'agar blanc à 5% NaCl colorée par le *bleu de Coomassie*.

La protéine	L'aspect macroscopique	
	Surface	Revers
Hémoglobine		
BSA		
Albumine		



Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : BENHAMOUDA Ikram  
MEZDOUR Meriem Nour El Imene  
FRIFET Dalel

**Thème :** Impact du stress salin sur l'activité protéolytique du genre *Penicillium sp.*

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

## Résumé

Cette étude s'intéresse à l'évaluation de la tolérance de champignon endophyte *Penicillium sp.*, isolé des racines d'*Hedysarum pallidum Desf.* au stress salin. Pour cela deux concentrations en NaCl (0% et 5%) ont été testées sur l'activité protéolytique produite par cette souche. La mise en évidence de l'activité protéolytique a été effectuée sur milieu d'agar blanc à base de quatre substrats protéiques : la caséine, la *Bovine serum albumin*, l'hémoglobine et l'albumine par la mesure des diamètres des zones de lyses apparaissent autour de la biomasse fongique. Les résultats montrent que le diamètre le plus important est observé sur des boîtes contenant 0% de NaCl, il est de 54mm pour la caséine et à 5% de NaCl il est de 40.3mm pour la *bovine serum albumin*. Le dosage de l'activité protéolytique est réalisé pour des extraits endocellulaires et exocellulaires obtenus par fermentation submergée sur un milieu gélatiné à pH 6,8 et à 28°C, contenant les quatre substrats : caséine, *bovine serum albumin*, hémoglobine et albumine et à deux concentrations en NaCl (0% et 5%). L'activité protéolytique endocellulaire à 0% la plus importante est obtenue en présence de l'albumine qui est de 302,22UI, et à 5% en présence de la *bovine serum albumin* qui est de 269,62UI. Pour l'activité protéolytique exocellulaires à 0% la plus importante est obtenue en présence de l'hémoglobine qui est de 273,33UI, et à 5% en présence de la caséine qui est de 117,77UI. Cette étude montre que *Penicillium sp.* a la capacité de tolérer et de s'adapter même dans un milieu salin (5% de NaCl) par la sécrétion des enzymes protéolytiques.

**Mots-clefs :** stress salin, NaCl, *Penicillium sp.*, champignon endophyte, activité protéolytique.

## Laboratoires de recherche :

Laboratoire de Génies Microbiologique et Applications et Laboratoire de Biologie et Environnement (LBE).  
(Université Frères Mentouri, Constantine 1).

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

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

**Examineur 2 :** KASSA-LAOUAR Mounia (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).