

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
d'*Aspergillus tubingensis***

Présenté par : BOUSSALIA Rania
ZITOUNI Nour El Houda

Le : 23 /06/2022

Jury d'évaluation :

Encadreur : MEGHNOUS Ouissem (MCB – Université Frères Mentouri Constantine 1).
Examineur 1 : KASSA-LAOUAR Mounia (MCB – Université Frères Mentouri Constantine 1).
Examineur 2 : BOULAHROUF Khaled (MCB – Université Frères Mentouri Constantine 1).

**Année universitaire
2021 – 2022**

Remerciements

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

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos plus vifs remerciements à notre encadrante Madame Meghnous Ouissem, Maître Assistante classe B à l'Université des Frères Mentouri- Constantine 1, qui a dirigé ce travail et de nous avoir si bien encadré, orienté et fait bénéficier de ses précieux conseils, sa riche expérience et de ses compétences. Pour sa patience, sa gentillesse, sa bienveillance, sa disponibilité et son soutien tout au long de la réalisation de notre mémoire. Nous sommes infiniment ravies et honorées d'avoir fait notre mémoire sous votre direction Docteur.

Nous tenons à exprimer notre grande considération et nos sentiments de reconnaissance à Mme. Kassa-Laour Mounia, Maître de conférences classe B à l'université des Frères Mentouri Constantine 1, qui a nous fait l'honneur d'être membre de ce jury.

Nos remerciements à Mr BOULAHROUF Khaled, Maître de conférences classe B à l'Université des Frères Mentouri- Constantine 1, d'avoir accepté de siéger dans ce jury et d'avoir consacré une partie de son temps à examiner ce modeste travail.

Nous adressons nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements à AYOUB et toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes très chers parents mon père Abdelhak et ma mère Sonia. Quoi que je fasse je ne pourrais pas leur rendre ce qu'ils ont fait, si je suis arrivée là c'est bien grâce à eux, Que dieu les bénisse, et leur accorde longue vie et les protège.

A mes chers frères Ahmed, Aymen Et Kamreddine.

A ma petite nièce adorable Jennah.

A mes belles-sœurs Lamia, Buchra.

A Mon Cher cousin Ayoub.

A ma meilleure collègue et amie Leila.

A toutes mes tantes.

A tous mes amies.

A tous ceux que j'aime.

Rania

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents 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, pour leur témoigner de mon immense amour et la reconnaissance pour tous les efforts et sacrifices qu'ils ont entrepris et qui n'arrêtent d'entreprendre à mon égard ;

A mes chères petites sœurs RAHMA et ZEYNEB à qui je souhaite tout le bonheur du monde et la réussite dans la vie ;

A mes adorables cousines et leurs enfants ;

A mes très chers amis ;

*A la personne qui a toujours su m'épauler et me pousser à aller de l'avant, à mon cher
ISLEM ;*

Nour El Houda

Liste des abréviations

BSA : albumine sérique bovine

CAS : caséine

HEMO: hemoglobin

ALB: albumine

PDA: *Potato dextrose agar*

Liste des figures

Figure 1 : modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes hôtes.	7
Figure 2 : principaux modes de transmission chez les champignons endophytes	8
Figure 3 : classes d'endophytes selon la localisation des tissus colonisés	9
Figure 4 : Mécanisme d'action des protéases.	16
Figure 5 : distribution des organismes sources d'enzymes industrielles	16
Figure 6 : classification des protéases	17
Figure 7 : mode d'action des protéases	19
Figure 8 : aspect macroscopique d' <i>Aspergillus tubingensis</i> sur milieu PDA	22
Figure 9 : aspect microscopique d' <i>Aspergillus tubingensis</i> sur PDA (G: 40)	23
Figure 10 : incubation de la culture submergée.	25
Figure 11 : filtration de la culture submergée	26
Figure 12 : broyage de la biomasse	26
Figure 13 : diamètres des zones de lyse en absence et présence de NaCl.....	31
Figure 14 : activité protéolytique spécifique endocellulaire et exocellulaire d' <i>A. tubingensis</i> à 0% et à 5% NaCl.	32

Liste des tableaux

Tableau 1 : classification des endophytes fongiques	10
Tableau 2 : activité protéolytique en absence et présence de 5% NaCl sur différents substrats protéiques	29

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Liste d'abréviation

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumés

Introduction 1

Revue bibliographique

Chapitre I : Stress salin

1. Généralités	3
2. Notion de stress	3
3. Stress salin	4
4. Contamination des sols par les sels.....	4
5. Effets du stress salin.....	4
5.1. Sur les plantes	4
5.2. Sur les microorganismes du sol	5
6. Rôle des champignons dans l'adaptation des plantes aux stress salin	5

Chapitre II : Champignons endophytes

1. Définition	7
2. Diversité	7
3. Mode de transmission	8
3.1. Transmission verticale	8
3.2. Transmission horizontale.....	8
4. Classification	9
5. Interaction endophyte-plante.....	10
5.1. Spécificité de l'hôte	10
5.2. Nature de relations endophytes- plantes	11

5.2.1.	Endophytes mutualistes	11
5.2.2.	Endophytes pathogènes latents	11
6.	Intérêts des champignons endophytes.....	11
6.1.	Rôle écologique des endophytes.....	12
6.1.1.	Stimulants de la croissance des plantes	12
6.1.2.	Protection des cultures.....	12
6.1.2.1.	Contre les stress biotiques	12
6.1.2.2.	Contre les stress abiotiques	13
6.1.3.	Phytoremédiation	13
6.2.	Intérêt thérapeutique	13
6.3.	Intérêt biotechnologique	14
6.3.1.	Biotransformation	14
6.3.2.	Production d'hydrocarbures	14
6.3.3.	Production d'enzymes.....	14

Chapitre III : Protéases

1.	Enzymes des endophytes	15
2.	Protéases	15
3.	Protéases des endophytes	16
4.	Classification des protéases.....	17
4.1.	Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique	17
4.1.1.	Exopeptidases	18
4.1.2.	Endopeptidases	18
4.2.	Selon le pH d'activité.....	18
4.3.	Selon la nature du résidu impliqué dans le site actif	18
5.	Mode d'action.....	18
6.	Applications des protéases fongiques.....	19
6.1.	En industrie alimentaire.....	19

6.1.1. En industrie laitière.....	20
6.1.2. En industrie boulangère.....	20
6.2. Médicale et pharmaceutique.....	20
6.3. Autres applications	21

Matériel et méthodes

1. Objectif.....	22
2. Matériel biologique	22
2.1. Origine et description de la souche	22
2.2. La réactivation de la souche	24
2.3. Mise en évidence de l'activité protéolytique sur milieux solides	24
2.4. Production des enzymes protéolytiques en culture submergée	25
2.4.1. Préparation des extraits enzymatiques.....	25
2.4.1.1. Extrait enzymatique exocellulaire	25
2.4.1.2. Extrait enzymatique endocellulaire.....	26
2.5. Méthodes analytiques	27
2.5.1. Dosage des protéines	27
2.5.2. Dosage de l'activité protéolytique.....	27

Résultats et discussion

1. Tolérance d' <i>Aspergillus tubingensis</i> au stress salin.....	28
2. Mise en évidence des activités protéolytiques.....	28
3. Dosage de l'activité protéolytique.....	32
Conclusion	35
Références bibliographique.....	36

Annexes

Résumé

Ce travail, vise à étudier l'aptitude de l'endophyte *Aspergillus tubingensis* MH189391 à tolérer et à produire des protéases en conditions de stress salin. Afin d'atteindre cet objectif, une mise en évidence de l'activité protéolytique a été réalisée sur milieu gélosé en absence et en présence de 5% NaCl et additionnée de différentes sources de protéines étant la seule source de carbone et d'azote à savoir la caséine, l'albumine, l'hémoglobine, la BSA, le lait et le sang frais. La souche a montré une tolérance à la présence de 5% de NaCl, cette adaptation à cette concentration en sel s'est traduite par des zones de protéolyse plus importante par rapport au témoin avec des diamètres variants entre 17 et 54 mm. Cependant, la production des protéases par fermentation sur milieu synthétique à base de la gélatine en absence et en présence de 5% NaCl a révélé que les extraits enzymatiques endocellulaire et exocellulaire ont montré que 5% de NaCl stimule la synthèse de protéases. De plus, les protéases produites par *A. tubingensis* en présence de 5% NaCl ont présenté plus d'affinité pour la caséine avec des activités spécifiques de 14916,96 U/mg et de 3534,80 U/mg d'extrait endocellulaire et exocellulaire respectivement.

Mots-clés : stress salin, NaCl, endophyte, *Aspergillus tubingensis*, protéases.

Abstract

This work, aims to study the ability of the endophyte *Aspergillus tubingensis* MH189391 to tolerate and produce proteases under salt stress conditions. In order to achieve this objective, a demonstration of proteolytic activity was carried out on agar medium in the absence and presence of 5% NaCl and with the addition of different protein sources being the only source of carbon and nitrogen including casein, albumin, hemoglobin, BSA, milk and fresh blood. The strain showed tolerance to the presence of 5% NaCl, this adaptation to this salt concentration resulted in larger proteolytic zones compared to the control with diameters varying between 17 and 54 mm. However, the production of proteases by fermentation on gelatin-based synthetic medium in the absence and presence of 5% NaCl revealed that endocellular and exocellular enzymatic extracts showed that 5% NaCl stimulates protease synthesis. In addition, the proteases produced by *A. tubingensis* in the presence of 5% NaCl exhibited more affinity for casein with specific activities of 14916.96 U/mg and 3534.80 U/mg of endocellular and endocellular extract respectively.

Key words: salt stress, NaCl, endophytic fungi, *Aspergillus tubingensis*, proteases.

ملخص

يهدف هذا العمل إلى دراسة قدرة الفطر الداخلي *Aspergillus tubingensis* MH189391 على تحمل وإنتاج البروتياز تحت ظروف اجهاد ملحي. لتحقيق هذا الهدف، تم إجراء اختبار لنشاط التحلل البروتيني على وسط زراعي في غياب وفي وجود 5% من كلوريد الصوديوم مع استكماله بمصادر بروتينية مختلفة كمصدر وحيد للكربون والنيتروجين وهي الكازين والألبومين والهيموغلوبين و BSA والحليب والدم الطازج. اظهرت السلالة تحملا لوجود 5% كلوريد الصوديوم ويتضح ذلك عبر مناطق التحلل البروتين الكبيرة مقارنة بالشاهدة بأقطار تتراوح بين 17 و 54 مم. ان إنتاج البروتياز عن طريق التخمر في وسط اصطناعي يعتمد على الجيلاتين في غياب وبوجود 5 % كلوريد الصوديوم أظهر أن المستخلصات الأنزيمية الخلوية الداخلية والخارجية أظهرت أنه بوجود تركيز 5 % من كلوريد الصوديوم يحفز على إنتاج البروتياز وان هذه البروتيازات المنتجة بواسطة *A. tubingensis* بوجود 5 % من كلوريد الصوديوم أظهر تفضيل للكازين مع نشاط محدد قدره 14916.96 وحدة / مجم و 3534.80 وحدة / مجم من المستخلصات الانزيمية الداخلية والخارجية على التوالي.

الكلمات المفتاحية: الاجهاد الملحي، NaCl، الفطريات الداخلية، *Aspergillus tubingensis*، البروتياز

Introduction

Les contraintes environnementales sont les facteurs majeurs limitant de l'agriculture et de la productivité des plantes (Chaves et *al.*, 2002). En plus des stress biotiques, il existe une variété de stress abiotiques, dont la salinité est considérée comme un facteur majeur limitant du développement des plantes (Munns et Tester, 2008). En Algérie, une grande partie des régions agricoles se caractérisant par un climat aride et semi-aride ; et 3,2 millions d'hectares sont menacées par la salinisation, ce qui se répercute sur la croissance et le développement des plantes et par conséquent sur leur productivité (Benmahioul et *al.*, 2009).

Actuellement, il est devenu impératif d'adopter de nouvelles approches pour réaliser un développement biotechnologique et assurer le recyclage et le renouvellement des ressources naturelles. A cet égard, l'homme a pensé se retourner vers la nature et cherche les vertus d'intérêt économique chez les microorganismes, à travers les associations que forment ces derniers avec leurs plantes hôtes (Mansouri, 2011). Parmi ces associations symbiotiques, l'endophytisme, qui est selon Petrini (1991) et Dutta et *al.* (2014) les microorganismes (bactéries, champignons, ...) colonisant les tissus internes des plantes (Dutta et *al.*, 2014), sans causer aucun symptôme apparent de maladie.

Les endophytes fongiques sont considérés et reconnus comme GRAS (*Generally Regarded As Safe*), ils présentent des effets positifs sur la plante hôte notamment dans l'amélioration de la croissance ainsi que la résistance et la tolérance aux stress biotiques et abiotiques (Rodriguez et *al.* 2009) et leur aptitude à produire une large gamme d'enzymes à utilités biotechnologiques.

Selon Corrêa et *al.* (2014), l'exploitation des champignons endophytes occupe une place importante dans les différents domaines biotechnologiques. D'ailleurs, ces dernières années, plusieurs travaux scientifiques ont prouvé que les champignons endophytes présentent une source potentielle d'enzymes participant à la dégradation de la matière végétale, ces enzymes appelées « *Cell Wall Degrading Enzyme : CWDE* » qui appartiennent à la classe des hydrolases. Il s'agit principalement des cellulases, des β -glucanase, des amylases, des pectinases, des lipases et des protéases (Amirita et *al.*, 2012).

Les protéases fongiques sont parmi les enzymes les plus employées en industrie. Leur vente comptant pour 60% de toutes les ventes d'enzymes au niveau mondiale. Les protéases halostables, supportant des concentrations élevées en NaCl, comptent d'une grande

importance biotechnologique. Elles sont employées dans l'industrie, en particulier dans la détergence et la transformation des aliments ainsi que dans les applications biomédicales et analytiques. De plus, il a été montré que les champignons endophytes du genre *Aspergillus* sont des excellents producteurs de protéases.

L'objectif du présent travail est de mettre en évidence l'aptitude de l'endophyte *Aspergillus tubingensis* à produire des enzymes protéolytiques dans des conditions de stress salin afin de démontrer son intérêt biotechnologique.

Le présent travail est scindé en trois parties ;

- La première partie est consacrée à la description de données bibliographiques relatives aux concepts clés notamment le stress salin, les endophytes et les protéases.
- La deuxième partie expérimentale renferme les techniques et les méthodes ainsi que les résultats et leur discussion.
- Enfin, ce travail est clôturé par une conclusion générale et des perspectives

Revue bibliographique

1. Généralités

Le sol est considéré comme un système composé de particules minérales, de matière organique, d'eau, d'air et d'organismes vivants (NF ISO 15799, 2004). Ces derniers sont en interactions continues par des échanges de matière et d'énergie due à plusieurs processus physiques, chimiques, biologiques ce qui explique l'ensemble des opérations de pédogenèse et les rôles du sol (Calvet, 2003).

Dans de nombreuses zones des régions méditerranéennes, en particulier les zones côtières, les maraîchers sont contraints d'utiliser de l'eau salée ce qui constitue une préoccupation majeure qui entrave la productivité des cultures et la stabilité des rendements (Rouphael *et al.*, 2012).

La présence du chlorure de sodium dans les eaux d'irrigation peut perturber d'importants processus morphologiques, biochimiques et physiologiques conduisant à un retard de croissance et de rendement avec des pertes économiques importantes pour les producteurs (Rouphael *et al.*, 2020).

Le stress salin affecte la croissance à travers de plusieurs facettes du métabolisme, telles que l'absorption et la distribution des nutriments au sein de la plante, la modification de la photosynthèse et de la respiration, la synthèse des protéines et des acides nucléiques, la production d'enzymes, l'équilibre hormonal et la disponibilité de l'eau (El-Iklil *et al.*, 2001).

La salinité est un principal facteur environnemental de l'accumulation du sel dans les sols, elle réduit considérablement leur fertilité. Ce phénomène est constaté dans les régions arides et semi-arides, en particulier dans les cultures irriguées par l'eau salée ce qui va limiter la croissance et la productivité des plantes. En effet les dommages d'une forte salinité sur les plantes peuvent être observés au niveau de la plante entière comme la diminution de la croissance et/ou la mort des plantes (Parida et Das, 2005 ; Tarek, 2021).

2. Notion de stress

Le stress est l'ensemble des perturbations physiologiques ou pathologiques provoqués dans l'organisme par des agents biotiques (parasite, pathogène) ou abiotiques (salinité, sécheresse, température, pollution...etc.) ce qui résulte éventuellement en des dégâts, des dommages, des blessures, inhibition de la croissance ou de développement au niveau moléculaire, cellulaire, et de l'organisme entier (Hopkins, 2003 ; Maarouf et Raynaud, 2007).

3. Stress salin

Mansouri et Ouzzani (2017) ont défini la salinité des sols par la présence dans les processus pédologiques par lesquels ils sont anormalement riches en sels solubles et acquièrent ainsi des caractéristiques de salinité. Le stress salin est un facteur environnemental très important limitant la croissance et la productivité agricoles et peut aussi réduire l'activité microbienne. La forte salinité du sol est principalement due à la présence d'une forte concentration en Chlorure de Sodium, qui est un facteur limitant de la croissance (Drevon et *al.*, 2001).

4. Contamination des sols par les sels

Un sol salin représente les caractéristiques physicohydriques suivantes : une faible perméabilité, une faible conductivité hydraulique et une instabilité des agrégats (Maganhotto et *al.*, 2012).

Le sel présent dans les sols peut influencer les processus pédologiques par le biais de la concentration de sel dans la solution du sol, qui détermine le potentiel osmotique, et de la concentration de sodium dans le complexe d'échange du sol, qui influence la stabilité structurelle du sol (Yan et *al.*, 2015).

Selon Shahid et *al.* (2018), les causes de la salinité des sols peuvent être nombreuses ; les sources les plus courantes sont les suivantes :

- Salinité inhérente du sol (altération des roches, matériau parental).
- Eau d'irrigation saumâtre et saline.
- Drainage limité et remontée de la nappe phréatique.
- Évaporation de surface et transpiration des plantes.
- Les embruns d'eau de mer, les vapeurs condensées qui tombent sur le sol sous forme de pluie.
- Les sels transportés par le vent donnent des champs salés.
- L'utilisation excessive d'engrais (chimiques), d'amendements du sol (chaux et gypse) et de boues d'épuration et/ou d'effluents d'épuration traités.

5. Effets du stress salin

5.1. Sur les plantes

Parida et Das (2004) ont déclaré que les effets néfastes de la forte salinité sur les plantes peuvent être observés au niveau de la plante entière comme la mort de plantes et/ou une

diminution de la croissance. De nombreuses plantes développent des mécanismes soit pour exclure le sel de leurs cellules ou pour tolérer sa présence à l'intérieur des cellules. Au cours de l'apparition et le développement du stress salin dans une plante, tous les processus majeurs tels que la photosynthèse, la synthèse des protéines et le métabolisme énergétique et lipidique sont affectés. La réponse la plus précoce est une réduction du taux d'expansion de la surface des feuilles, suivie d'un arrêt de la croissance

5.2. Sur les microorganismes du sol

Les communautés microbiennes du sol jouent un rôle fondamental dans le cycle des nutriments, dans le volume de la matière organique du sol et dans le maintien de la croissance des plantes hôtes. Le stress peut être préjudiciable aux microorganismes sensibles et diminue l'activité des cellules survivantes, en raison de la charge métabolique imposée par la nécessité de mettre en place des mécanismes de tolérance au stress. Un climat sec et chaud, de faible humidité et de forte salinité du sol présente les facteurs les plus stressants pour la flore microbienne du sol, et se produisent souvent simultanément (Yan et *al.*, 2015).

Selon Omar et *al.* (1994), signalent que les champignons étaient plus sensibles au stress osmotique que les bactéries, car ils ont observé une réduction significative du nombre total des champignons dans les sols salinisés avec différentes concentrations de chlorure de sodium. De même, avec une augmentation du niveau de NaCl à plus de 5%, le nombre total de bactéries et d'actinobactéries a été considérablement réduit.

6. Rôle des champignons dans l'adaptation des plantes aux stress salin

L'amélioration de la croissance des plantes par des stratégies de résistance au stress abiotique est une grande approche de l'agriculture durable, car elle réduit l'utilisation de produits chimiques. Les champignons endophytes font partie de cette stratégie. Ils améliorent le rendement et la qualité des cultures en réduisant le stress abiotique. L'interaction symbiotique plante-champignon est une approche prometteuse pour atténuer le stress salin chez les plantes (Badawy et *al.*, 2021).

Les interactions microbiennes bénéfiques les plus connues sont les champignons mycorhiziens, elles atteignent 80% de toutes les espèces de plantes terrestres (Harrison, 2005). Rouphael et *al.* (2020) ont suggéré que l'application de champignons symbiotiques tels que les endophytes appartenant au genre *Trichoderma* et les champignons mycorhiziens

pourrait être des outils potentiellement efficaces pour atténuer l'effet néfaste de la salinité. De plus, l'endophyte *Aspergillus aculeatus* induire la tolérance au stress salin chez le gazon (Xie et al., 2016).

Rouphael et al. (2020) ont suggéré que l'application de champignons symbiotiques tels que les endophytes appartenant au genre *Trichoderma* et les champignons mycorhiziens pourrait être des outils potentiellement efficaces pour atténuer l'effet néfaste de la salinité. De plus, l'endophyte *Aspergillus aculeatus* induire la tolérance au stress salin chez le gazon (Xie et al., 2016).

De même, Badawy et al. (2021) ont rapporté qu'à 400 mM NaCl, les plantes de soja colonisées par *Aspergillus flavus* ont montré une stimulation de la synthèse de la chlorophylle, une augmentation de manière significative la longueur des racines et des pousses. Ceci est due à une modulation des niveaux des hormones végétales endogènes et des activités des enzymes antioxydantes.

1. Définition

Le mot endophyte est issue du grec : « *Endo* » ou « *Endon* » signifiant à l'intérieur et « *phytes* » ou « *phyton* » qui désignant « plante ». Les endophytes désignent les microorganismes (ex : Bactéries, champignons...etc.) colonisent les tissus végétaux sans endommager la plante hôte. Ce sont des endogènes qui vivent dans l'espace intercellulaire des tissus, donc ils colonisent les cellules vivantes pendant toute ou une partie de leur cycle de vie (Belhamra et Benbouzid, 2021 ; Ngoc My et Thanh, 2021).

Les endophytes fongiques au sens large sont des champignons capables d'occuper sans symptômes apparentés des tissus végétaux apparemment sains (figure 01), cette définition englobe pratiquement tous les spectres des interactions symbiotiques entre les champignons et les plantes : parasitisme, commensalisme et mutualisme (Stone et *al.*, 2012).

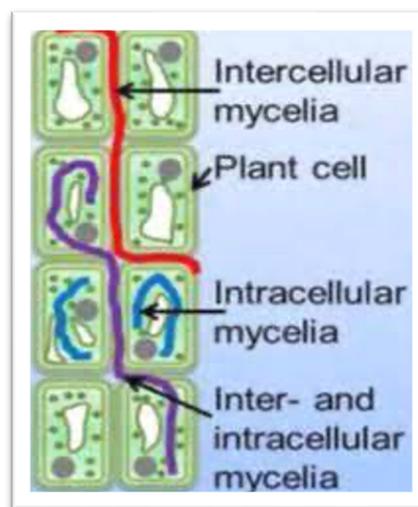


Figure 1 : modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes hôtes (Andéol et Benjamin, 2016).

2. Diversité

Selon Rodriguez et *al.* (2009), la plupart des plantes dans les écosystèmes naturels sont symbiotiques avec des champignons mycorhiziens et/ou des endophytes fongiques. De plus, Strobel (2003) rapporte que des champignons endophytes ont été isolés dans près de 300.000 espèces de plantes terrestres en l'occurrence des plantes des déserts chauds, de la toundra arctique, des mangroves, des forêts tempérées et tropicales, des prairies et des savanes, et des terres cultivées, où chaque plante abritant un ou plusieurs de ces champignons.

Les mycoendophytes sont présents dans tous les organes des tissus végétaux, ils sont hétérotrophes et prélèvent leurs nutriments de leur hôte sans provoquer des maladies (Saikkonen et *al.*, 2004).

3. Mode de transmission

Le mode de transmission est la façon par laquelle le champignon endophyte peut coloniser un autre individu végétal à partir d'un hôte initial. Deux modes de transmission observés chez les champignons endophytes (figure 02) (Andéol et Benjamin, 2016).

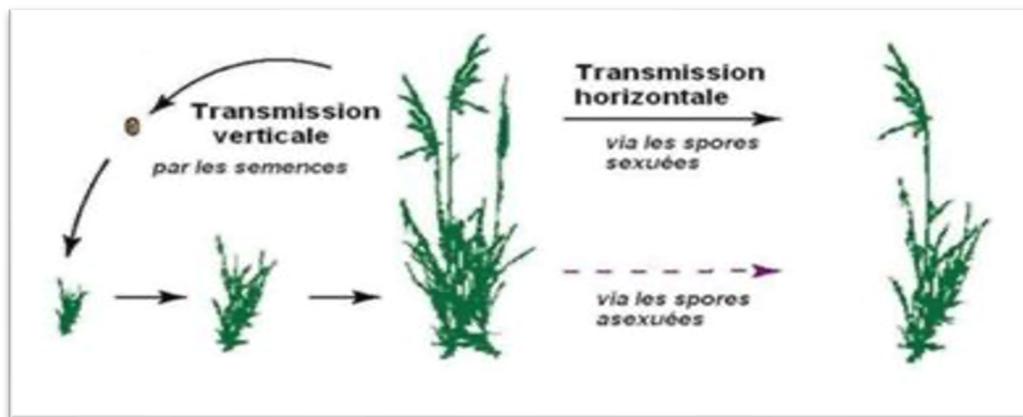


Figure 2 : principaux modes de transmission chez les champignons endophytes (Saikkonen et *al.*, 2004).

3.1. Transmission verticale

C'est le principal mode de transmission des champignons endophytes appelé aussi la croissance végétative des hyphes (Belhamra et Benbouzid, 2021). Ce mode de transmission permet la contamination de la descendance de l'hôte primaire par l'intermédiaire des graines : un grain de pollen ou une propagule de la plante hôte. Le champignon reste génétiquement identique mais il peut s'implanter soit dans un clone, soit dans un hôte génétiquement différent, issu d'une nouvelle génération (Arnold et *al.*, 2003 ; Andéol et Benjamin, 2016).

3.2. Transmission horizontale

D'après Andéol et Benjamin (2016), la plupart des espèces endophytes, colonisant les végétaux présentent ce mode de transmission. Il se fait entre des plantes de la même espèce ou d'espèces différentes. Le champignon peut être transmis soit par des spores sexuées ou asexuées pour infecter d'autres plantes, ces dernières sont disséminées par le vent ou par des insectes phytophages pour infecter d'autres plantes hôtes (Arnold et *al.*, 2003).

4. Classification

La classification des champignons endophytes est basée sur les taxonomies de gamme d'hôtes, les modes de transmission de la colonisation, la spécificité des tissus (figure 03) et la fonction écologique. Les champignons endophytes sont divisés en deux grands groupes : le premier groupe est celui des endophytes *Clavicipitaceae* (C-endophytes) qui infectent certaines graminées. Le deuxième est celui des endophytes non *Clavicipitaceae* (NCendophytes) (Khiralla et al., 2016).

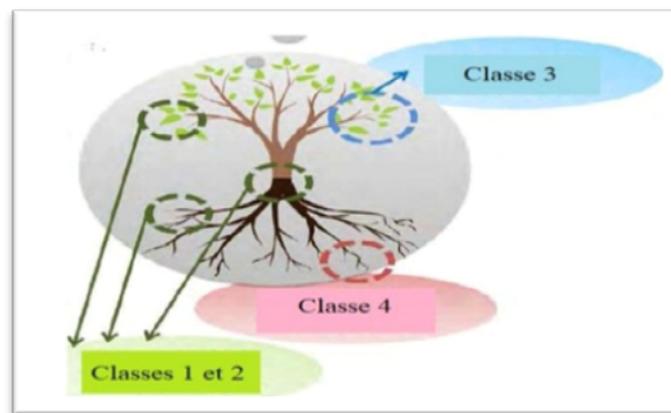


Figure 3 : classes d'endophytes selon la localisation des tissus colonisés (Chirane et Merzoud., 2019)

Néanmoins, Rodriguez et al. (2009) énoncent un autre point de vue sur la classification des endophytes fongiques, ils classent les endophytes fongiques en deux groupes majeurs (*Clavicipitaceae* et Non *Clavicipitaceae*) subdivise en quatre classes. Cette classification est basée sur : la phylogénie, les origines évolutives, l'histoire de vie et les impacts sur l'aptitude de la plante hôte (tableau 01).

Tableau 1 Classification des endophytes fongiques (Rodriguez et al., 2009).

	<i>Clavicipitaceae</i>	Non <i>Clavicipitaceae</i>		
Critères	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Gamme d'hôtes	Étroit	Vaste	Vaste	Vaste
Tissus colonisé	Tiges, racines et Rhizomes	Tiges, racines et Rhizomes	Tiges	Racines
Colonisation des plantes	Extensive	Extensive	Limitée	Extensive
Transmission	V/H	V/H	H	H
Benefice physique	NAH	NAH/AH	NAH	NAH

Non adapté à l'habitat (NAH) : des avantages tels que la tolérance à la sécheresse et l'accélération de la croissance sont courants chez les endophytes, quel que soit leur habitat d'origine. * Adapté à l'habitat (AH) : les avantages résultent de pressions de sélection spécifiques à l'habitat telles que le pH, la température et la salinité. *(V) : verticale. *(H) : horizontale.

5. Interaction endophyte-plante

Il existe une grande variété de relations entre les champignons endophytes et leurs plantes hôtes, allant de mutualistes ou symbiotiques à antagonistes ou légèrement pathogènes (Arnold, 2007).

5.1. Spécificité de l'hôte

La spécificité de l'hôte est la relation dans laquelle un champignon est limitée à un seul hôte ou à un groupe d'espèces apparentées, mais ne se présente pas dans d'autres espèces végétales non apparentées dans le même habitat (Khiralla et al., 2016).

Certains chercheurs n'ont trouvé aucune ou très peu de preuves de spécificité de l'hôte chez les endophytes, or, Khiralla et al. (2016) ont rapporté que Petrini en 1991 a utilisé deux termes différents : la spécificité d'établissement et la spécificité d'expression pour identifier cette relation.

Petrini (1991) définit la spécificité d'établissement lorsqu'un endophyte ne colonise que des espèces végétales sélectionnées. Tandis que la spécificité d'expression est la colonisation de plusieurs hôtes par un champignon donné, mais en formant des structures spécifiques (généralement des fructifications) sur un nombre limité de taxons végétaux.

5.2. Nature de relations endophytes- plantes

5.2.1. Endophytes mutualistes

Les endophytes sont généralement considérés comme des mutualistes protecteurs agissant contre les insectes herbivores et les champignons pathogènes (Carroll, 1995). La preuve du mutualisme exige non seulement que les endophytes soient présents dans les tissus attaqués et que leur présence soit corrélée.

Dans ce cas d'interaction mutualiste, l'endophyte et la plante retirent tous deux d'un avantage. Les bénéfices retirés sont tous aussi variés pour les deux organismes. La plante peut bénéficier d'une augmentation de sa croissance, de sa résistance envers les stress biotiques et abiotiques (Hamilton et Bauerle, 2012). Il est aussi supposé que la colonisation d'un endophyte active la résistance systémique de la plante et elle peut ainsi améliorer la réaction de défense contre les pathogènes (Bourdel, 2015).

5.2.2. Endophytes pathogènes latents

Il n'est pas facile de distinguer l'agent pathogène de l'endophyte, puisque de nombreux phytopathogènes prolongent la phase d'infection asymptomatique avant l'apparition des symptômes de la maladie jusqu'à ce que les symptômes soient induits pour apparaître en tant que conditions environnementales ou conditions nutritionnelles (Selim et *al.*, 2016).

Sieber (2017) rapporte que les espèces *d'Apiognomonina*, *Ophiovalsa*, *Pezicula* ou *Phomopsis* sont considérées comme des espèces d'arbres pathogènes, ces pathogènes ont évolué conjointement avec leurs hôtes et ne peuvent donc pas être très virulents, et les symptômes ne sont observés que très rarement et limités à des localités uniques où les symptômes se développent généralement sur quelques branches d'un seul arbre.

Les endophytes de certaines plantes peuvent devenir un agent pathogène pour d'autres plantes, selon la relation entre le pouvoir pathogène et l'endophytisme du micro-organisme dans les différents hôtes (Saikkonen et *al.*, 2004)

6. Intérêts des champignons endophytes

Plusieurs recherches affirment que les champignons endophytes ont un effet important sur la santé, l'écologie et l'évolution des plantes. Divers groupes de ces microorganismes sont capables de produire un certain nombre d'agents bioactifs (Selim et *al.*, 2016).

6.1. Rôle écologique des endophytes

6.1.1. Stimulants de la croissance des plantes

Les endophytes peuvent favoriser directement ou indirectement la croissance des plantes et le taux de germination, leurs métabolites fournissent une variété d'avantages aux plantes hôtes. De nombreux endophytes sont responsables de la solubilisation du phosphate, de l'augmentation de l'absorption du phosphore, de la fixation de l'azote, la production de sidérophores, et d'hormones végétales comme l'auxine, les abscisines, l'éthylène, les gibbérellines et l'acide indole acétique (IAP). Ces hormones sont essentielles pour les régulations de la croissance des plantes (Sudha et *al.*, 2016).

6.1.2. Protection des cultures

Les champignons endophytes sont également capables d'induire une résistance aux maladies. Les mécanismes de la résistance induite par les endophytes sont liés au statut nutritionnel de l'hôte, et à l'augmentation de la l'aptitude des plantes en augmentant leur tolérance au stress (Sudha et *al.*, 2016).

6.1.2.1. Contre les stress biotiques

Les endophytes protègent leurs plantes hôtes contre les attaques d'autres microbes, insectes et animaux herbivores (Rnan et *al.*, 2019). La plupart des endophytes clavicipitacés améliorent la résistance des plantes hôtes aux insectes.

Les bénéfiques proviennent en partie de la production de mycotoxines alcaloïdes, la loline et la peramine, qui sont généralement liées à la résistance aux insectes. De plus, ces endophytes sont qualifiés comme des dissuadant d'herbivores mammifères de se nourrir, parce qu'ils produisaient des mycotoxines comme l'ergot de seigle et l'alcaloïde lolitrem. De même, certaines études ont indiqué que ces endophytes exerçaient une activité antinématodes (Khiralla et *al.*, 2016).

De nombreux endophytes de classe II protègent les plantes hôtes dans une certaine mesure contre les pathogènes fongiques par différentes stratégies comme la production de métabolites secondaires (Rodriguez et *al.*, 2009).

6.1.2.2. Contre les stress abiotiques

De nombreux facteurs environnementaux ont des effets sur la croissance et la survie des plantes. Il a été constaté que les plantes colonisées par des champignons endophytes ont une plus haute résistance à la sécheresse, aux températures élevées, à la toxicité des métaux et à la salinité (Derkaoui, 2015).

Chez la plante médicinale *Dichantheium lanuginosum*, qui vit dans des régions où les températures du sol peuvent atteindre 57 °C, Selim et al. (2012) suggère que la présence des endophytes peut augmenter la capacité de la plante de tolérer cette température. Également, les plantes colonisées par l'endophyte *Curvularia sp.* ont montré une meilleure résistance aux températures élevées du sol et au stress hydrique comparativement aux plantes sans endophyte. De plus, *Piriformospora indica* induit une résistance aux maladies fongiques et la tolérance au stress salin chez l'orge (Selim et al., 2012).

6.1.3. Phytoremédiation

Les endophytes peuvent jouer un rôle dans le processus de phytoremédiation et la dégradation des toxines environnementales, indirectement par l'amélioration de la croissance des plantes, ou bien directement par la dégradation et/ou l'accumulation de polluants par les endophytes eux même (Sudeha et al., 2016).

6.2. Intérêt thérapeutique

Les champignons endophytes sont considérés comme un arsenal de nouvelles molécules bioactives (Strobel et al., 2004). Ils produisent le plus grand nombre de métabolites secondaires (Zhang et al., 2006), avec une grande diversité structurale comprenant les alcaloïdes (amines, amides...), les peptides, les stéroïdes, les terpénoïdes, les phénols, les quinones, les composés aliphatiques, les flavonoïdes etc. (Yu et al., 2010).

Ces substances naturelles produites par ces champignons endophytes possèdent un large spectre d'activité biologique (Zhang et al., 2006), comme des antibiotiques, des antifongiques, des antiviraux, des immunosuppresseurs, des agents anticancéreux, des antioxydants, des insecticides et d'autres substances biologiquement actives (Strobel et al., 2004).

6.3. Intérêt biotechnologique

6.3.1. Biotransformation

C'est l'utilisation des systèmes biologiques pour produire des changements chimiques à des composés qui ne sont pas dans leurs substrats naturels. De telles modifications aboutissent à la formation de nouveaux produits utiles qui ne sont pas faciles à préparer par des méthodes chimiques. Les endophytes sont capables de produire des nombreuses enzymes, qui peuvent donc être utilisés comme des biocatalyseurs dans la transformation chimique des produits naturels et de médicaments, en raison de leur capacité à modifier les structures chimiques avec un haut degré de stéréospécificité (Selim et *al.*, 2012).

6.3.2. Production d'hydrocarbures

La recherche d'autres sources d'énergie devient importante, car les sources du carburant liquide diminuent, selon Selim et *al.* (2016). Les champignons endophytes ont montré une capacité de produire des composés liés aux carburants, ces composés sont compatibles avec la présence d'infrastructures mobiles et renouvelables, qui dépendent de la technologie des carburants de substitution. De plus, ils ont la capacité de libérer des produits gazeux sur des déchets cellulosiques, des déchets de bois, des composés volatils bioactifs et beaucoup d'entre eux sont liés aux carburants (Selim et *al.*, 2016).

6.3.3. Production d'enzymes

Les endophytes ont une grande capacité à produire diverses nouvelles enzymes qui pourraient être utilisées dans diverses applications biotechnologiques (Selim et *al.*, 2012), les principales industries utilisant les enzymes microbiennes sont les industries cosmétiques, les détergents, l'énergie, la chimie fine, l'alimentation, le cuir, le papier, les produits pharmaceutiques et les textiles (Rnan et *al.*, 2019).

Les enzymes provenant d'endophytes fongiques sont parfois isolées de plantes médicinales (*Alpinia calcarata*, *Bixa orellana*, *Calophyllum inophyllum* et *Catharanthus roseus*), et sont utilisées dans les industries de l'alimentation, des boissons, de la confiserie, du textile et du cuir pour simplifier le traitement des matières premières (Derkaoui, 2015).

1. Enzymes des endophytes

Un grand nombre de microorganismes non pathogènes sont capables de produire des enzymes à grandes utilités biotechnologiques dans divers domaines, à l'instar du traitement des aliments, la fabrication des détergents, de textiles, de produits pharmaceutiques, de thérapies médicales et en biologie moléculaire (Rajput et *al.*, 2016).

Les microorganismes les plus utilisés sont les champignons filamenteux en raison de leur facilité de culture et leur production élevée. De plus, ils sont considérés et reconnus comme GRAS (*generally regarded as safe*) (Bezzera et *al.*, 2021).

Selon Uzma et *al.* (2016), les endophytes fongiques ont été explorés pour diverses applications biotechnologiques en raison de leur production des enzymes extracellulaires comme mécanisme de résistance contre l'invasion pathogène et pour obtenir la nutrition de l'hôte. Ces enzymes comprennent les pectinases, les cellulases, les lipases, la laccase, la xylanase, la catalase, la phytase, les α -1,4- glucane lyases, les phosphatases et les protéases ; qui selon Souza et *al.* (2015) et Sanchez et Demain (2017) représentent environ 60% d'enzymes commerciales dans le monde.

Sunitha et *al.* (2013) ont rapporté que L'échec de l'exploitation des champignons endophytes dans ce domaine dépend de la mauvaise compréhension actuelle de la signification évolutive de ces organismes et de leur interaction dynamique avec leurs hôtes respectifs (Sunitha et *al.*, 2013).

Par conséquent, un besoin impératif de découvrir et d'utiliser diverses nouvelles enzymes à haute stabilité pour les procédés industriels.

2. Protéases

Selon la définition du comité de nomenclature de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB), les protéases sont des hydrolases agissant sur les liaisons peptidiques entre les acides aminés de la structure des protéines (Souza et *al.*, 2015) (figure 04). Le clivage de ces liaisons peptidiques conduit à la dégradation des substrats protéiques en peptones, polypeptides, dipeptides et enfin en acides aminés (Salleh et *al.*, 2006 ; Souza et *al.*, 2015).



Figure 4: Mécanisme d'action des protéases (<https://nutrixeal-info.fr/index/protéases/>).

3. Protéases des endophytes

Selon Shankar et *al.* (2021), la production des protéases par les champignons endophytes filamenteuses s'est développée au cours des dernières années en raison de la grande variété d'enzymes produites et de la facilité de la séparation des mycéliums et des milieux de culture par rapport aux autres sources bactériennes, végétales et animales (figure 05).

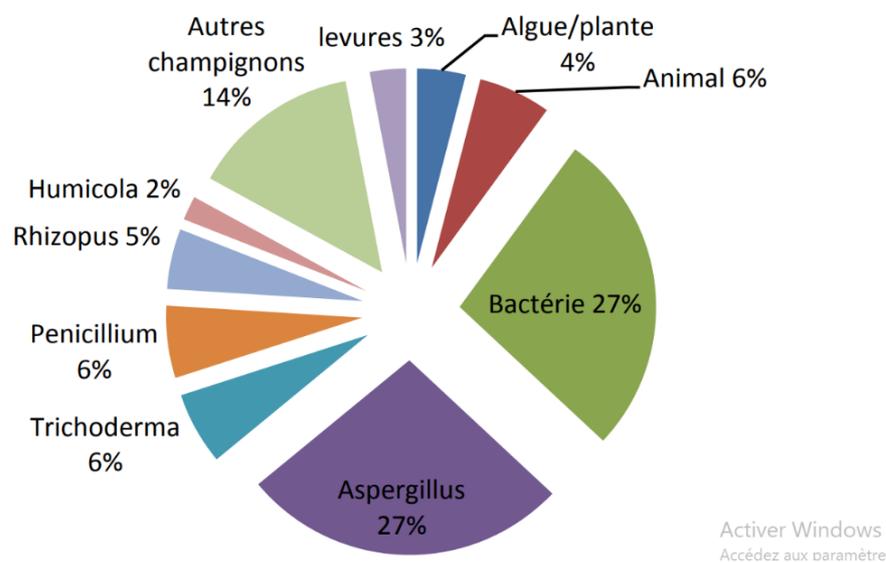


Figure 5: distribution des organismes sources d'enzymes industrielles (Østergaard et Olsen, 2010).

Bezerra et *al.* (2021) a montré que différentes espèces de champignons endophytes sont d'excellentes productrices de protéases, avec des applications potentielles dans différents domaines industriels. Le genre *Penicillium* a la plus grande capacité de produire des protéases, suivi par *Aspergillus*, *Alternaria*, et *Xylaria*.

De plus, Manimekalai et *al.* (2021) ont rapporté qu'*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. clavatus*, *Rhizopus*, ces espèces sont généralement considérées comme des producteurs des protéases extracellulaires stables. Les protéases synthétisées par *Aspergillus tamaris* ont des caractéristiques pour des applications dans l'industrie alimentaire (Alves et *al.*, 2021).

4. Classification des protéases

Les protéases possèdent une grande diversité dans leur structure et leur mécanisme d'action, et ne peuvent pas être classées dans le système général des enzymes. Donc elles sont classées selon le système général de nomenclature enzymatique (Medina et *al.*, 2019). Leur classification peut être basée sur le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique, le groupe fonctionnel présent sur le site actif et la valeur de pH optimale (Mienda et *al.*, 2014).

4.1. Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique

Les peptidases sont subdivisées en deux classes, en fonction de leur mode d'attaque ; les endopeptidases et les exopeptidases. Les deux classes de protéase sont divisées en plusieurs classes et sous classes (Gurumallesh et *al.*, 2019) (figure 06).

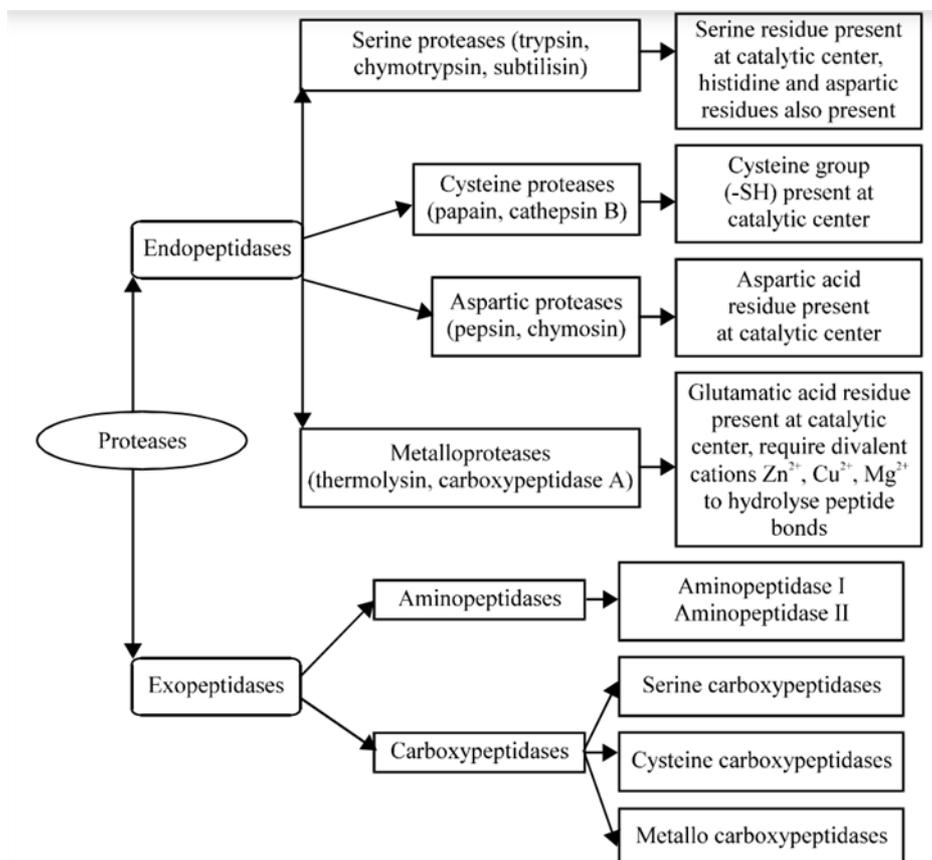


Figure 6 : classification des protéases (Kumar et *al.*,2008).

4.1.1. Exopeptidases

Elles agissent sur les liaisons peptidiques terminales d'une protéine soit à l'extrémité N (aminopeptidases) ou C (carboxypeptidases), ce qui donne des acides aminés libres (Medina *et al.*, 2019).

4.1.2. Endopeptidases

Selon Medina *et al.* (2019), elles agissent au niveau des liaisons peptidiques internes d'une protéine, ce qui donne lieu à de courtes chaînes peptidiques. Les endopeptidases sont divisées sur la base de leurs mécanismes catalytiques en aspartate-endopeptidases, sérine-endopeptidases, cystéine-endopeptidases, métallo-endopeptidases (Kumar *et al.*, 2008).

4.2. Selon le pH d'activité

Les protéases sont très sensibles aux changements de pH dans le milieu réactionnel. Elles sont classées selon leur pH d'activité optimale en protéases alcalines pH [8,0-13,0], neutres pH [6,0-8,0] et les protéases acides pH [2,0 - 6,0] (Tavano, 2017).

4.3. Selon la nature du résidu impliqué dans le site actif

Sur la base des séquences primaires et la spécificité des sites actifs des acides aminés et selon la classification de référence disponible dans des bases de données électroniques MEROPS. Il existe sept familles d'endopeptidases : Aspartyl, Cystéyl, Métallo, Séril, Glutamyl, Asparagyl et Thréonyl-protéases (Benchiheub, 2015).

5. Mode d'action

Le mode d'action des protéases varie d'une enzyme à une autre selon la nature du site actif. Ce processus catalytique se résume en trois étapes :

Dans les deux premières étapes, l'enzyme déforme les liaisons peptidiques et améliore la polarité du groupe carbonyle, en favorisant son attaque nucléophile ce qui conduit à la formation de liaison covalente transitoire entre le fragment portant le carbonyle du substrat et l'enzyme avec la libération de l'autre morceau (le premier produit) protoné par un proton cédé d'un résidu enzymatique.

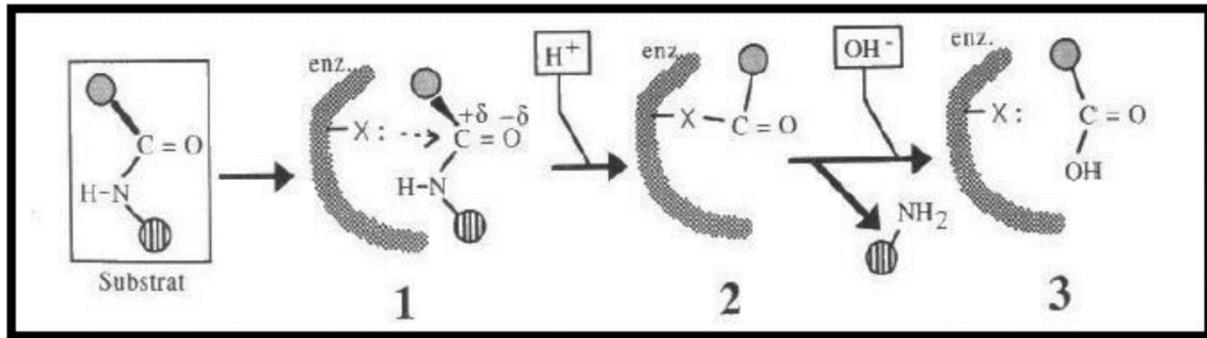


Figure 7 : mode d'action des protéases (Plumont, 1995).

La troisième étape consiste à une nouvelle substitution nucléophile OH^- d'une molécule d'eau et libère le deuxième produit de la réaction, le site actif de l'enzyme et régénéré par des protons (à partir de H_2O) (figure 07) (Pelmont, 1995).

6. Applications des protéases fongiques

Les protéases sont d'une grande importance biotechnologique. Elles sont employées dans l'industrie, en particulier dans la détergence et la transformation des aliments ainsi que dans les applications biomédicales et analytiques (Li et *al.*, 2013 ; Tavano et *al.*, 2018).

6.1. En industrie alimentaire

La protéolyse est un outil puissant pour modifier les propriétés des protéines. Elle provoque des changements dans la solubilité, les propriétés gélifiantes, l'émulsification et de moussage. Ces propriétés ont qualifié ces enzymes comme étant un procédé idéal pour les applications en industries alimentaire tell que l'attendrissement de la viande, la coagulation du lait et la panification. La modification protéolytique des aliments est également accompagnée par une amélioration des propriétés de la valeur nutritionnelle et de la qualité sensorielle de ces aliments (Panyam et Kilara, 1996).

Alves et *al.* (2021) ont montré que le genre *Aspergillus* étant distribué dans le monde entier est reconnu par la production des protéases entrant dans la biosynthèse chimique et dans la transformation de composés, en plus de fournir plusieurs applications dans l'alimentation l'industrie.

6.1.1. En industrie laitière

Selon Aguilar et *al.* (2008), les protéases acides, neutres et basiques, produites par *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* et autres espèces du genre *Mucor* ont été également employées en industrie laitière dans la coagulation du lait et la maturation de différents types de fromages, elles jouent un rôle très important dans l'hydrolyse des protéines en peptides simples et en acide aminés, en particulier en acide glutamique qui caractérise la saveur des fermentations orientales (Loffler, 1986).

6.1.2. En industrie boulangère

Les protéases d'*Aspergillus sp.* sont utilisées pour hydrolyser le gluten de la farine du blé à un degré plus ou moins important, selon les caractéristiques désirées de la pâte. Rao et *al.* (1998) ont rapporté que le traitement enzymatique de la pâte facilite sa manipulation et son usinage ceci permet la fabrication d'une plus large gamme de produits. De plus, il a été signalé que les protéases fongiques et microbiennes sont utilisées pour améliorer l'extensibilité et la résistance de la pâte.

6.2. En industrie médicale et pharmaceutique

Les protéases fongiques occupent une position centrale dans la signalisation cellulaire et les processus physiologiques qui se produisent dans le corps humain. Elles possèdent des activités antivirales, anti-inflammatoires, antioxydantes et antitumorales grâce à la présence de composés bioactifs (Chanalia et *al.*, 2011).

Mukhtar et Ul-haq (2009) ont mentionné qu'*Aspergillus oryzae* et *A. flavus* et l'endophyte *Fusarium sp* (Wu et *al.*, 2009), possédaient une activité fibrinolytique (protéolytique). Cette protéase peut avoir des applications potentielles dans la thérapie thrombolytique et dans la prévention de la thrombose.

Les protéases hémolytiques sécrétées par *Pleurotus sp.* possèdent différentes activités dans les processus cellulaires. La sécrétion d'hémolysine par *P. nebrodensis* présente des activités apoptotiques et antiprolifératives qui sont impliquées dans le ciblage des cellules cancéreuses. Ces protéases se lient étroitement aux protéines réceptrices du VIH et les inhibent. Certaines protéases isolées de *P. ostreatus* possèdent des activités contre différents carcinomes (Naeem et *al.*, 2022).

6.3. Autres applications

Les protéases fongiques sont utilisées pour les synthèses organiques afin de produire des peptides et d'autres composés non protéiques tels que les esters. Elles sont également utilisées pour la récupération de l'argent des déchets de films photographiques (Jane et *al.*, 2011 ; Białkowska et *al.*, 2016).

Naeem (2022) a rapporté que la sécrétion mycélienne des basidiomycètes saprophytes *Serpula lacrymans*, *Pleurotus ostreatus* et *Irpex lacteus*. *Pleurotus sp.* a conduit à la découverte des protéases telles que les subtilases ayant les mêmes propriétés que celle de *Penicillium ostreatus* et *P. chrysosporium*, ce même auteur a signalé que ces basidiomycètes ont également produit des protéases impliquées dans le mécanisme ligninolytique par une dégradation fragmentée de la e laccase pendant la croissance.

Dans les travaux de Corrêa et *al.* (2014) et Khan et *al.* (2017) portant sur la bioremédiation par les endophytes *Aspergillus tubingensis* et *Pestalotiopsis microspora* qui ont été évalués pour leur capacité à dégrader efficacement le polyester polyuréthane par la sérine protéase produite par ces deux endophytes.

Matériel et méthodes

1. Objectif

La partie expérimentale a été réalisée au niveau de laboratoire de Biologie et Environnement de l'université des Frères Mentouri Constantine 1.

Le présent travail a pour objectif l'évaluation de la tolérance et la mise en évidence de l'aptitude de l'endophyte *Aspergillus tubingensis* à produire des enzymes protéolytiques en utilisant plusieurs substrats et dans des conditions de stress salin (en présence de 5% NaCl).

2. Matériel biologique

2.1. Origine et description de la souche

La souche fongique étudiée est *Aspergillus tubingensis* MH189391 (figure 08 et 09), un endophyte isolé des racines d'une plante hyper accumulatrice de sels et de métaux lourds, *Hedysarum pallidum* Desf. de la région d'Ain Babouche et plus précisément sur Djebel Hamimat. Cette souche fongique a été conservée au laboratoire à -20°C dans des cryotubes dans le bouillon Sabouraud à 20% de glycérol.

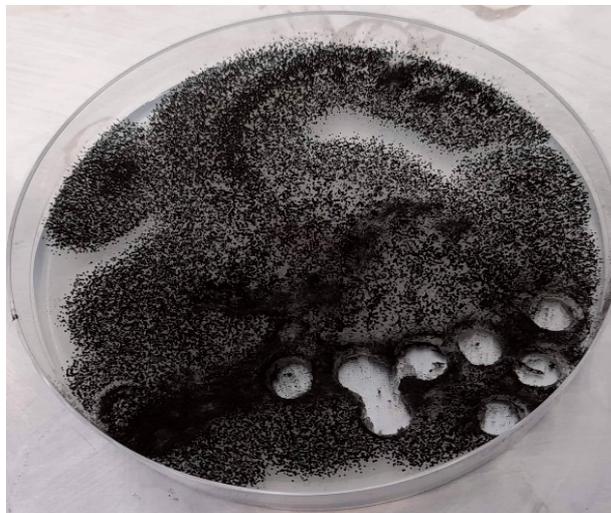


Figure 8 : aspect macroscopique d'*Aspergillus tubingensis* sur milieu PDA

L'endophyte *Aspergillus tubingensis* appartient à la section Nigri (Aspergilli noir), qui est une moisissure de la famille des Trichocomaceae. Elle a été décrite en 1943 par Raoul Mosseray au Congo belge (Samson et *al.*, 2014).

Cette souche montre une croissance rapide en couvrant la gélose avec une poudre blanche au début de la croissance qui devient noire pendant le développement. Les diamètres des colonies sont supérieurs à 85 mm après 7 jours de culture à 28 °C. Dans ces conditions, le champignon filamenteux présente une forte sporulation (Olarte et *al.*, 2015, Meghnous, 2020).

Sous microscope optique *Aspergillus tubingensis* présente des têtes conidiennes brunes foncées à noires, généralement abondantes et légèrement floclées. Les conidiophores (70-90 µm) semblent avoir une granulation de surface limitée. Les conidies ont une taille de 3-5 µm avec un aspect épineux. D'ailleurs, ces caractéristiques morphologiques sont vraiment proches de celles d'*A. niger* (Olarte et *al.*, 2015).

D'après Samson et *al.*, (2007), le test rapide pour distinguer les deux taxons est la réaction d'Ehrlich, qui teste la présence d'indole. Dans ce test, *A. tubingensis* donne un résultat négatif, contrairement à *A. niger*, qui donne un résultat positif.

De même, la production d'asperacine par *A. tubingensis* distingue cette espèce des autres *Aspergillus* morphologiquement similaires.

➤ **Position systématique (Mosseray, 1943)**

- Règne : Fungi
- Sous-Règne : Dikarya
- Phylum : Ascomycota
- Classe : Eurotiomycotina
- Sous-Classe : Eurotiomycetideae
- Ordre : Eurotiales
- Famille : Trichocomaceae
- Genre : *Aspergillus*
- Espèce : *Aspergillus tubingensis*

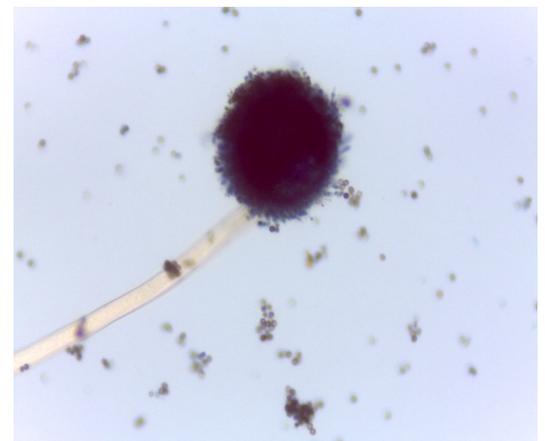


Figure 9 : aspect microscopique d'*Aspergillus tubingensis* sur PDA (X40)

Aspergillus tubingensis a une morphologie similaire de celle d'*A. niger* donc ils sont difficiles à discriminer sans recourir à des méthodes moléculaires pour les différencier. Le séquençage des gènes codant pour la calmoduline ou la β -tubuline sont utilisées de manière fiable (Samson et *al.*, 2007).

2.2. La réactivation de la souche

La souche a été régénérée par repiquage du mycélium de l'endophyte *Aspergillus tubingensis* sur milieux PDA (Potato Dextrose Agar) (annexe 01) à 30°C pendant six jours. Les cultures obtenues servent d'inoculum pour la suite du travail.

2.3. Mise en évidence de l'activité protéolytique sur milieux solides

La mise en évidence de l'activité protéolytique est réalisée sur le milieu agar blanc à pH=6,8. Pour conférer des conditions de stress salin, le milieu agar blanc a été additionné de 5% de chlorure de sodium. Les milieux sans et avec NaCl sont puis autoclavés pendant 20 min à 120°C (annexe 01).

Les géloses d'agar blanc sans et avec 5% NaCl ont été utilisées de quatre types de protéines comme seule source de carbone et d'azote. Les protéines sont : la caséine, l'albumine, l'hémoglobine et la BSA ont préparées des solutions stock de 1%. Ces préparations ont subi une stérilisation préalable : une pasteurisation de l'albumine et une tyndallisation de trois cycles de 24 heures pour la caséine, l'hémoglobine et la BSA pour éviter la dénaturation des protéines (Vermelho et *al.*, 1996) (annexe 01).

Pour vérifier la qualité des produits commercialisés en l'occurrence l'hémoglobine et la caséine, 1 mL de sang frais a été prélevée aseptiquement et rajoutée directement dans 100 mL d'agar blanc avec et sans NaCl), de même pour le lait entier à 1% qui, a été rajouté aseptiquement à l'agar blanc en surfusion.

Les milieux ont été coulés dans des boîtes de Pétri, puisensemencés par touche à l'aide d'une anse à boucle. L'incubation a lieu dans une étuve réglée à 30°C pendant quatre jours. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque essais.

La production des protéases par *Aspergillus tubingensis* est mise en évidence par l'apparition de zones claires sous et autour du mycélium, correspondant à l'hydrolyse des protéines testées. La révélation de ces zones se fait à l'aide du bleu de Coomassie (annexe 01).

2.4. Production des enzymes protéolytiques en culture submergée

La production des enzymes protéolytiques par *Aspergillus tubingensis* est réalisée en fermentation submergée dans des flacons de 250 mL contenant 50 mL de bouillon synthétique à base de gélatine (annexe 01) à 0% (témoin) et à 5% de NaCl (trois répétitions ont été effectuées). Chacun de ces flacons a été inoculé par quatre disques d'une culture jeune de l'endophyte, puis les flacons sont incubés dans un incubateur agitateur rotatif pendant six jours à 28°C sous agitation à 165 rpm (Haddadi et Hamrani, 2017) (figure 10).



Figure 10 : incubation de la culture submergée.

2.4.1. Préparation des extraits enzymatiques

2.4.1.1. Extrait enzymatique exocellulaire

Après fermentation, les cultures obtenues sont filtrées sur papier Whatman n°1. Le filtrat clair représente l'extrait enzymatique exocellulaire brut (figure 11). Ces extraits ont été congelés pour les dosages ultérieurs.



Figure 11 : filtration de la culture submergée

2.4.1.2. Extrait enzymatique endocellulaire

Les biomasses récupérées après filtration sont lavées avec de l'eau distillée stérile afin d'éliminer les résidus du milieu de culture ; 0,5 g des biomasses fraîches (0 et 5% NaCl) ont été broyées dans d'azote liquide (figure 12). Les protéines sont ensuite extraites à 4°C avec 3 mL du tampon phosphate de potassium 50 mM à froid (pH 7,0) contenant 0,1% de triton X-100 (v/v) et 1% de polyvinylpyrrolidone (PVP) (w/v). L'homogénat est centrifugé à 4°C pendant 15 min à 14000×g et le surnageant obtenu présente l'extrait enzymatique endocellulaire brut (Meghnous et *al.*, 2019).



Figure 12 : broyage de la biomasse

2.5. Méthodes analytiques

2.5.1. Dosage des protéines

La quantité de protéines contenue dans les extraits enzymatiques est estimée par la méthode de Lowry et *al.* (1951) (annexe 02). Le taux de protéines est calculé par référence à une courbe d'étalonnage établie à partir d'une solution standard de l'albumine sérique bovine (BSA) comme protéine étalon (annexe 03).

2.5.2. Dosage de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est déterminée par l'utilisation de différents substrats à savoir : la caséine, l'hémoglobine et la BSA, dans les conditions adoptées par Mechakra et *al.*, (1999). (annexe 02).

Une unité (U) de protéase est l'équivalent de 1 μg de tyrosine libérée pendant 1 h de temps par 1 mL de l'extrait enzymatique, en utilisant la tyrosine comme étalon (annexe 03).

Résultats et discussion

L'objectif du présent travail est l'évaluation de la tolérance et de la mise en évidence l'aptitude de l'endophyte *Aspergillus tubingensis* à produire des enzymes protéolytiques dans des conditions de stress salin.

1. Tolérance d'*Aspergillus tubingensis* au stress salin

La souche *Aspergillus tubingensis* est capable de croître même en présence de 5% NaCl, il a présenté une bonne croissance à cette concentration par rapport au témoin.

Selon Meghnous (2020), l'endophyte *A. tubingensis* est tolérant aux métaux lourds à savoir 100 ppm d'arsenic et 500 mM d'antimoine. Cette tolérance est due à l'adaptation préalable de cet endophyte au stress métallique, ceci est traduit par la production des enzymes hydrolytiques.

Jaouani et al. (2014) rapportent que trois espèces du genre *Aspergillus* étaient capables de se développer dans des milieux contenant 10% de sel avec un pH initial de 10, et que la protéase était l'enzyme la plus abondante produite.

De même, Boucherit et al. (2022) trouvent que *Penicillium chrysogenum* atteint une croissance optimale à 15 % de NaCl, 25 °C, pH 5, à l'obscurité, en condition aérobie et que ce champignon est capable de produire les enzymes extracellulaires suivantes: laccase, caséinase, tannase, estérase et lipase

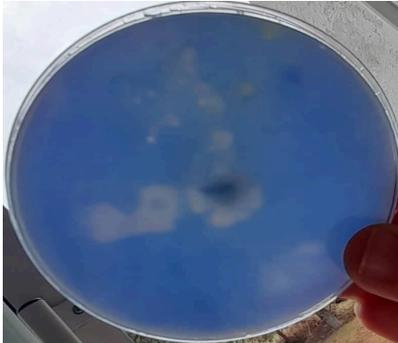
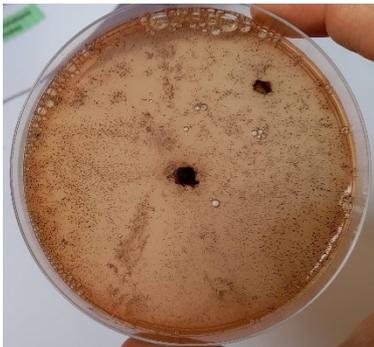
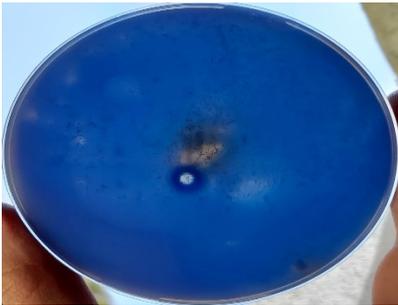
2. Mise en évidence des activités protéolytiques

L'activité protéolytique de l'endophyte fongique *Aspergillus tubingensis* a été réalisée sur le milieu agar blanc à base de différente source de protéines étant la seule source de carbone et d'azote en absence et en présence de 5% NaCl.

L'apparition de zones claires sous et autour des mycéliums fongiques après 96 heures d'incubation, correspond à l'hydrolyse des différents substrats protéiques en peptides et acides aminés solubles.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 2 : activité protéolytique en absence et en présence de 5% NaCl sur différents substrats protéique.

Substrat	Absence de NaCl	Présence de NaCl (5%)
Albumine sérum bovine (BSA)		
Caséine (CAS)		
Sang frais		
Albumine (ALB)		

Lait		
Hémoglobine (Hémo)		

Les tests de protéolyse réalisés dans cette étude montrent qu'*Aspergillus tubingensis*, présente des zones d'hydrolyse plus importante à 5% NaCl qu'à 0% NaCl, dont les diamètres des zones de lyses à 5% NaCl sont : 54 mm, 52 mm, 32 mm, 25,2 mm, elles correspondent à la caséine, le lait, l'hémoglobine et la BSA respectivement. Alors qu'une faible zone d'hydrolyse est constatée à l'albumine uniquement autour du mycélium avec un diamètre de 17 mm à la même concentration. Contrairement aux autres protéines, le sang frais a présenté une zone d'hydrolyse de diamètres de 63,4 mm à 0% NaCl et 8,16 mm à 5% NaCl.

L'histogramme ci-dessous résume les résultats des diamètres des zones d'hydrolyse obtenus chez *Aspergillus tubingensis*.

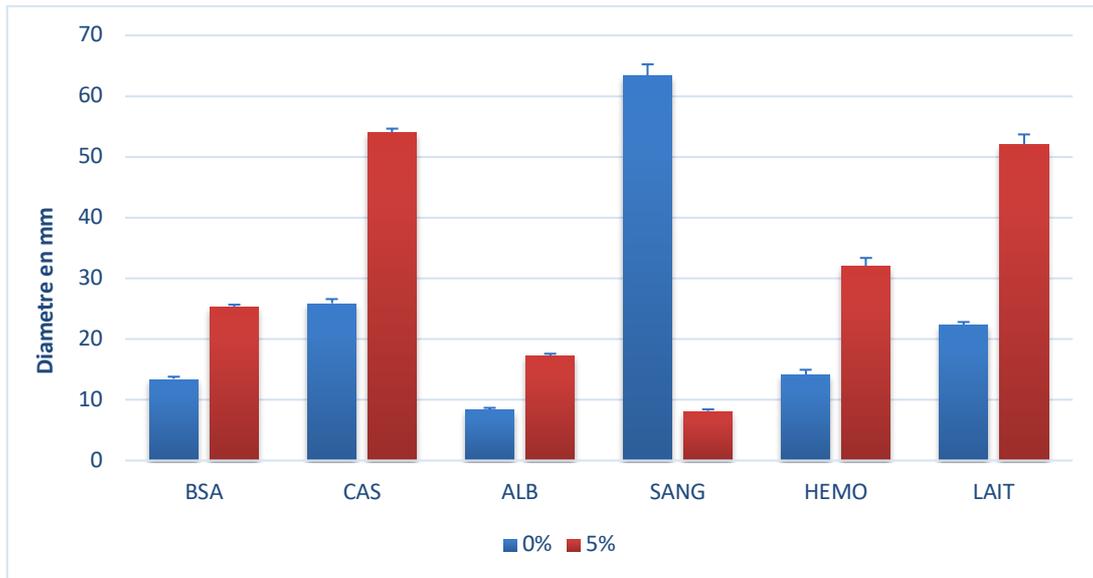


Figure 13 : diamètres des zones de lyse en absence et présence de NaCl

La figure 13 indique qu'à 5 % NaCl, *Aspergillus tubingensis* présente une meilleure hydrolyse des protéines testées par rapport à 0% NaCl, où les diamètres des zones de lyse révèlent un taux d'augmentation de : 53,29% pour BSA, 48,46% pour ALB, 47,96% pour CAS, 42,49% pour le lait et 44,27% pour Hemo comparativement aux diamètres des zones de lyses en absence de NaCl.

Les différences entre ces zones d'hydrolyse produites pourraient être liée à la quantité de protéase libérée par le champignon dans le milieu comme il a été suggéré par Bensmail *et al.*, (2015). D'ailleurs dans leurs travaux qui ont révélé qu'*A. niger* FFB1 présente une activité protéolytique traduite par la zone claire autour de la colonie sur la gélose Czapeck-Dox modifiée additionnée par la caséine crée après l'hydrolyse de la caséine en peptides et acides aminés solubles.

Une faible protéolyse dans le sang fraisa est remarquée à 5 % NaCl avec un taux de réduction de plus de 85% par référence à 0% NaCl. Ceci peut être expliqué par l'inhibition de la protéase due à l'hypersalinité du milieu ou l'enzyme a hydrolysé facilement les protéines plasmatiques que l'hémoglobine qui est emprisonnée dans les globules rouges.

La comparaison des zones d'hydrolyses des différents substrats testés, a permis de sélectionner trois substrats à savoir la caséine, l'hémoglobine et la BSA pour le dosage de l'activité protéolytique.

3. Dosage de l'activité protéolytique

L'activité enzymatique est exprimée en unité internationale qui correspond à une μg de tyrosine libérée pendant une heure et par millilitre d'extrait.

Les protéases catalysent la réaction d'hydrolyse des protéines et des polypeptides aboutissant à la formation de peptides simples et des acides aminés libres. Sachant que la tyrosine est l'acide aminé le plus abondant dans toutes les protéines, il est donc utilisé comme un standard pour le dosage colorimétrique de l'activité protéolytique par le réactif de Folin-Ciocalteu.

Les résultats des dosages enzymatiques des extraits protéolytiques exocellulaires et endocellulaires d'*Aspergillus tubingensis* obtenus à partir des cultures submergées à 0% NaCl et 5% NaCl, sur les trois substrats : caséine, hémoglobine et BSA sont réunis dans l'histogramme suivant (figure 14) :

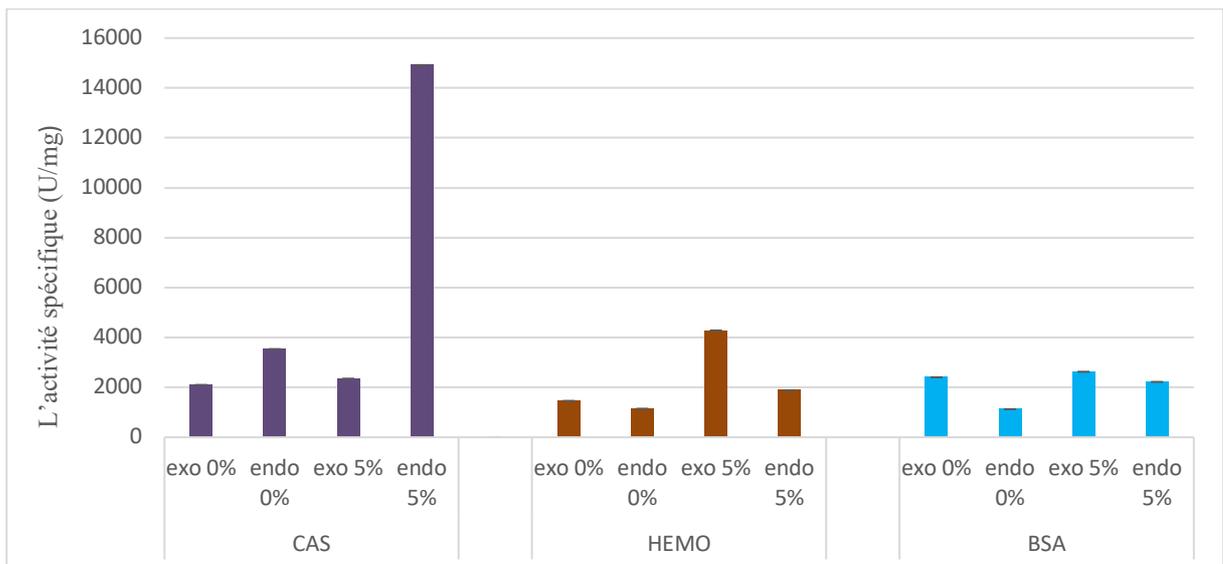


Figure 14 : activité protéolytique spécifique endocellulaire et exocellulaire d'*A. tubingensis* à 0% et à 5% NaCl.

La présente étude démontre que l'activité spécifique protéolytique d'*Aspergillus tubingensis* est stimulée à 5% NaCl pour les trois substrats et les deux d'extraits enzymatiques testés. Ce résultat va vers le même sens que les résultats obtenus sur le milieu gélosé.

Selon Sinsuwan *et al.* (2008) l'augmentation de l'activité protéolytique à 5% NaCl s'explique par une augmentation des interactions hydrophobes entre le site actif de la protéase et son substrat. Elle est provoquée par la présence d'une faible concentration de NaCl, conduisant à une augmentation de l'activité protéolytique.

La meilleure activité protéolytique est enregistrée à 5% NaCl en utilisant la caséine comme substrat et l'extrait enzymatique endocellulaire avec une activité spécifique de 14916,96 U/mg, suivie par l'hémoglobine d'extrait exocellulaire avec une activité de 4281,16 U/mg puis la BSA exocellulaire avec une activité de 2625,85 U/mg.

Ce résultat révèle que la protéase produite par *Aspergillus tubingensis* a une meilleure affinité pour la caséine du lait, suivie de l'hémoglobine puis la BSA.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Nakadai et *al.* (1973) qui ont trouvé que 4% de NaCl est un stimulateur de l'activité de la protéase neutre d'*A. oryzae*. De même, Boucherit (2011) a montré dans ces travaux que l'activité protéasique maximale est obtenue à une concentration de 5 % NaCl dans les conditions optimales. De plus, la présence de NaCl à un taux de 0,1% se traduit par un effet positif très significatif sur la production protéique qui correspond à une augmentation de 15,48% (Belmassikh, 2011).

L'activité caséinolytique est plus importante dans l'extrait enzymatique endocellulaire en présence et en absence de NaCl avec des activités spécifiques de 14916,96 U/mg et 3534,80 U/mg respectivement. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Barbar et *al.* (2007) qui ont étudiés *in vitro* l'hydrolyse de la caséine par la plasmine. Ils ont constaté que l'activité protéolytique augmente à pH 6,5 et entre 0% et 8% de NaCl. Selon Laxman et *al.* (2005), le NaCl a montré un effet d'agent stabilisateur de l'activité enzymatique protéolytique, et il n'y a aucun besoin d'addition d'agent de conservation.

Quant à l'hémoglobine commercialisée et la BSA leurs meilleures activités protéolytiques ont été enregistrées de l'extrait exocellulaire avec des activités de 4281,16 U/mg et 2625,85 U/mg dans l'ordre.

Il est important de signaler que les géloses contenant la caséine comme la seule source de carbone ont présenté les plus grandes zones de lyse au-dessous du mycélium fongique. Ceci est corroboré par la forte activité endoprotéasique en présence de 5 % NaCl. Or, à cette même concentration les zones d'hydrolyses dispersées autour des mycéliums fongiques sont constatées sur les géloses de l'hémoglobine et la BSA désignant ainsi leurs activités exolytiques considérables.

Conclusion

L'objectif de ce travail de recherche est la production des protéases dans des conditions de stress salin par l'endophyte fongique *Aspergillus tubingensis* MH189391. Ce travail s'inscrit dans une approche qui consiste à l'exploitation des microorganismes résistants aux stress abiotiques en favorisant leur émergence dans divers domaines biotechnologiques.

Dans cette étude *Aspergillus tubingensis* MH189391 a été étudiée pour sa capacité de tolérer la salinité et de produire des protéases sur plusieurs sources de protéines comme seule source de carbone et d'azote en absence et en présence de 5% du NaCl.

Sur les milieux solides, l'endophyte *Aspergillus tubingensis* a démontré une bonne croissance en présence de NaCl, il était capable de croître même en présence de 5% NaCl. Cette souche a montré une activité protéolytique significative par des zones d'hydrolyse plus importante à 5% NaCl : 54 mm, 52 mm, 32 mm, 25,2 mm et 17 mm correspondant à la caséine, le lait, l'hémoglobine, la BSA, et l'albumine respectivement. Par contre, le sang frais présente des zones d'hydrolyse très importante de plus de 60 mm à 0%.

Afin de confirmer les résultats obtenus sur milieu gélosé additionnée des protéines, des dosages d'activité protéolytique des extraits enzymatiques endocellulaire et exocellulaire, en présence et en absence de NaCl sont réalisés pour : la caséine du lait, l'hémoglobine et la BSA. Les résultats obtenus révèlent une cohérence avec les résultats obtenus sur la gélose.

L'activité protéolytique est stimulée en présence de 5% NaCl. L'extrait endocellulaire et l'exocellulaire d'*A. tubingensis* ont démontré une meilleure affinité à la caséine avec une activité spécifique de 14916,96 U/mg et 3534,80 U/mg respectivement, par rapport aux autres protéines testées.

Ces résultats mettent en relief l'intérêt d'utiliser cet endophyte halotolérant pour la production de protéases halostables pour répondre aux exigences industrielles.

Au terme de ce travail il est intéressant de proposer certaines études complémentaires :

- Déterminer des paramètres cinétiques de ces enzymes.
- Purifier des extraits bruts de fermentation obtenus.
- Étudier des propriétés des enzymes purifiées.
- Rechercher pour une éventuelle application industrielle de ces enzymes.

Références bibliographiques

1. Aguilar C., Gutiérrez-Sánchez G., Rado-Barragán P., Rodríguez-Herrera., Martínez-Hernandez J. et Contreras-Esquivel C. (2008). Perspectives of Solid-State Fermentation for Production of Food Enzymes. *Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4(4), 354-366.
2. Alves R., Oliveira R., da Silva O., Porto F., Porto A. et Porto S. (2021). Extractive fermentation for process integration of protease production by *Aspergillus tamaris* Kita UCP1279 and purification by PEG-Citrate Aqueous Two-Phase System. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 01-08.
3. Amirita A., Sindhu P., Swetha j., Vasanthi NS. et Kannan KP. (2012). Enumeration of endophytic fungi from medicinal plants and screening of extracellular enzymes. *World Journal of Science and Technology*, 2(2), 13-19.
4. Andéol C. et Benjamin C. (2016). Les champignons endophytes : impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutique. thèse de doctorat : Pharmacie. Grenoble : Université Grenoble Alpes, 104.
5. Arnold A. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers, 21(2-3), 51- 66. doi:10.1016/j.fbr.2007.05.003
6. Arnold AE., Mejia LC., Kyllö D., Rojas EI., Maynard Z.; Robbins N. et Herre EA. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15649–15654. doi:10.1073/pnas.2533483100
7. Badawy A., Alotaibi M., Abdelaziz A., Osman M., Khalil A., Saleh A., Mohammed A. et Hashem A. (2021). Enhancement of seawater stress tolerance in barley by the endophytic fungus *Aspergillus ochraceus*. *Metabolites*, 11(7).
8. Belhamra E. et Benbouzid N. (2021). Production de molécules à activité anticancéreuse par le champignon endophyte *Taxomyces andreanea*. mémoire de master : Mycologie et Biotechnologie Fongique, Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine 1, 93.
9. Belmassikh A, (2011). Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Présenté pour l'Obtention du Diplôme de Magister : Microbiologie Appliquée, Constantine : Université Mentouri Constantine, 129.
10. Benchiheb M. (2015). Etude des protéases de quelques plantes endémiques. Purification, propriétés, mécanisme d'action et applications technologiques. Préparée pour l'obtention

- du Diplôme de Doctorat 3ème cycle LMD : Biotechnologie, Biologie et Environnement, Constantine : Université Constantine 1, 144.
11. Benmahioul B., Daguin F. et Kaid-Harche M. (2009). Effet du stress salin sur la germination et la croissance in vitro du pistachier (*Pistacia vera* L.), 332(8), 0–758. doi:10.1016/j.crv.2009.03.008
 12. Berbar A., Humbert G., Linden G. et Le Deaut J. (2007). Proteolyse in vitro des caseines par la plasmine sous l'action du ph et du NaCl. Recherche Agronomique, 11(20), 55-71.
 13. Bezerra, V., Cardoso SL., Fonseca-Bazzo Y., Silveira D., Magalhães PO. et Souza P.M. (2021). Protease Produced by Endophytic Fungi: A Systematic Review. Molecules, 26, 7062, 01-20. <https://doi.org/10.3390/>
 14. Białkowska A., Gromek T., Florczak J., Krysiak K., Szulczewska. et Turkiewicz. (2016). Extremophilic proteases: Developments of their special functions, potential resources and biotechnological applications. Biotechnology of Extremophiles Springer, 399-444. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13521-2_14
 15. Boucherit Z. (2011). Production et étude des propriétés de la protéase acide d'une moisissure isolée de sebkha .Présenté pour l'obtention du diplôme de magister : Microbiologie Appliquée, Constantine : Université Mentouri Constantine, 71.
 16. Boucherit Z., Flahaut S., Djoudi B., Mouas T., Mechakra A. et Ameddah S. (2022). Potential of Halophilic *Penicillium chrysogenum* Isolated from Algerian Saline Soil to Produce Laccase on Olive Oil Wastes, Current Microbiology, 79:178, 0- 10 <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02868-8>.
 17. Bourdel G. (2015). Diversité des organismes endophytes dans les racines de plantes poussant en milieu contaminé en hydrocarbures, Mémoire présenté à la Faculté des Arts et des Sciences en vue de l'obtention du grade de Maître des Sciences (M.Sc.) : Sciences Biologiques, Montréal : Université Montréal, 55.
 18. Calvet R. (2003). Le sol propriétés et fonctions. Tome 1 constitution, structure phénomènes aux interfaces. Paris : france agricole, 444.
 19. Carroll G. (1995). Forest endophytes: pattern and process. Canadian journal of botany, 73(1), 1316- 1324.
 20. Chanalia P., Gandhi D., Jodha D. and Jasbir Singh J. (2011). Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry. An overview in Medical Microbiology, 22, 96–101.
 21. Chaves M.M., Pereira J.S., Rodrigues M.L., Ricardo C.P., Osório M.L., Carvalho I., Faria T. et Pinheiro C. (2002). How plants cope with water stress in the Field: photosynthesis and growth. Annals of Botany, 89: 907-916.

22. Chirane A. et Merzoud Y. (2019). Evaluation de l'activité antibactérienne des champignons endophytes isolés d'*Artemisia herba alba*. Memoire de master : Microbiologie Appliquée, M'sila : Universite Mohamed Boudiaf, 51.
23. Corrêa R.G., Rhoden S.A., Mota T.R., Azevedo J.L., Pamphile J.A., de Souza C.M., Polizeli M.M., Bracht A. et Peralta R.M. (2014). Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(10), 1467–1478. doi:10.1007/s10295-014-1496-2
24. Derkaoui I. (2015). Etude des champignons endophytes halotolérants et producteurs de métabolites secondaires. Memoire De Master : Protection Des Végétaux, Blida : Universite De Blida 1, 95.
25. Dutta D., Puzari K., Gogoi R. et Dutta P. (2014). Endophytes: exploitation as a tool in plant protection. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(5), 621–629. doi:10.1590/S1516-8913201402043
26. El-Iklil Y., Karrou M., Mrabet D, et Benichou M. (2001). Effet du stress salin sur la variation de certains metabolites chez *Lycopersicon esculentum* et *Lycopersicon sheesmanii*, 177- 183.
27. Fungi: Occurrence, Classification, Function and Natural Products. *Microbiology Research Advances, Endophytic Fungi: Diversity, Characterization and Biocontrol*, New York, Evelyn Hughes, 163.
28. Gurumallesh P., Alagu K., Ramakrishnan, B. et Muthusamy S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081
29. Haddadi M. et Hamrani T. (2017). Activités amylolytiques et protéolytiques de certains champignons endophytes foliaires issus de l'ortie (*Urtica dioïca* L). Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master : Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master, Biochimie Appliquée, Tizi-Ouzou : Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou, 91 p.
30. Hamilton C.E, Bauerle T.L. (2012). A new currency for mutualism? Fungal endophytes alter antioxidant activity in hosts responding to drought. *Fungal Diversity*, 54(1), 39-49.
31. Harrison M. (2005). Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology*, 59: 19-42.
32. Hopkins W.G. (2003). Physiologie végétale. 2ème édition. De Boeck, Bruscelles, 476.
33. Jaouani A., Neifar M., Prigione V., Ayari A., Sbissi I., Ben Amor S., Ben Tekaya S., Varese G., Cherif A. et Gtari M. (2014). Diversity and Enzymatic Profiling of

- Halotolerant Micromycetes from Sebkha El Melah, a Saharan Salt Flat in Southern Tunisia. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/439197>
34. Jian S., Wenyi T. et Wuyong C. (2011). Kinetics of enzymatic unhairing by protease in leather industry. 19(4), 325–331. doi:10.1016/j.jclepro.2010.10.011
 35. Khan S., Nadir S., Shah Z., Shah A., Karunarathna SC., Xu., Khan A., Munir S. et Hasan F. (2017). Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*. Environmental Pollution, 225, 469–480. doi:10.1016/j.envpol.2017.03.012
 36. Kumar D., Savitri., Thakur N., Verma R. Et Bhalla T.C. (2008). Microbial Proteases and Application As Laundry Detergent Additive. Res . J. Microbiol, 3(12), 661-672.
 37. Laxman R.S., Sonawane A.P., More S.V., Rao B.S., Rele M.V., Jogdand V.V., Deshpande V.V. et Rao M.B. (2005). Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. 40(9), 3152–3. doi:10.1016/j.procbio.2005.04.005
 38. Li Q., L Yi., Marek P. et Brent L. (2013). Iverson Commercial proteases: Present and future. FEBS letters, 2013, 587(8), 1155-1163.
 39. Loffler A. (1986). Proteolytic enzymes: sources and applications. Food technology (USA).
 40. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. et Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem, 193:265.
 41. Maganhotto C.M., Souza Silva C. et Francisconi E. (2012). Effect of Salinity on Soil Microorganisms. Soil Health and Land Use Management.
 42. Manimekalai D.N., Senthilkumar G., Ambikapathy V. et Panneerselvam P. (2021). Efficacy of *Aspergillus* sp in the Production of Protease Enzyme with Different Substrates, British Journal of Pharmaceutical Research, 2231-2919.
 43. Mansouri A. (2011). Les champignons endophytes chez le blé dur (*Triticum durum*.Desf):
 44. Marouf A. et Reynaud J. (2007). La botanique de A à Z. 1662 définitions. Ed Dunod : Paris, 286.
 45. Mechakra A., Auberge 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.
 46. 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. Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3ème cycle : Biotechnologie et Bioprocédés, Applications Mycologiques, Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine1, 192 p.

47. Meghnous O., Dehimat L., Doumas P., Kassa-Laouar M., Mosbah F. et Rached O. (2019). Oxidative and antioxidative responses to antimony stress by endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* isolated from antimony accumulator *Hedysarum pallidum* Desf. *Biologia*, <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00305-z>
48. Mienda B.S., Adibah Yahya A., Galadima A. et Shamsir M.H. (2014). An overview of Microbial Proteases for Industrial Applications. *Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*.
49. Mukhtar H et Ul-Haq I. (2009). Production of Acid Protease by *Aspergillus niger* Using Solid State Fermentation. *Institute of Industrial Biotechnology*, 41(4), 253-260.
50. Munns R. et Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651–681.
51. Naeem M., Manzoor S., Abid, M., Tareen M., Asad M., Mushtaq S., Ehsan N., Amna D., Xu B. et Hazafa A. (2022). Fungal Proteases as Emerging Biocatalysts to Meet the Current Challenges and Recent Developments in Biomedical Therapies: An Updated Review. *J. Fungi*. <https://doi.org/10.3390/jof8020109>
52. Nakadaï T., Nasuno S. et Iguchi N. (1974). Purification et propriétés de la leucine aminopeptidase I–III d'*Aspergillus oryzae*. *Chimie agricole et biologique*, 37(4) ,757- 775
53. Ngoc My V et Thanh N. (2021). The Diversity of Endophytic *Aspergillus*, Biodiversity of Ecosystems, Ho Chi Minh City, Vietnam. Occurrence et rôle dans la tolérance au stress hydrique. p: 17-22.
54. Olarte R.A., Corne B.W., Singh R., et En ligne Carbone I. (2015). Recombinaison sexuelle chez *Aspergillus tubingensis*. *Mycologie*, 107(2), 307–312. doi:10.3852/14-233
55. Omar S., Abdel-Sater., Khallil A. et Abd - Alla M. (1994). Growth and Enzyme Activities of Fungi and Bacteria in Soil Salinized with Sodium Chloride, 23-2.
56. Panyam D. et Kilara A. (1996). Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in food science & technology*, 7(4), 120-125.
57. Parida A. et Das A. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3), 324-349.
58. Pelmont J. (1995). *Enzymes catalyseurs du monde vivant*. Presses Universitaire de Grenoble. Sciences Technologie Médecine, Grenoble. Paris. P. 619-655.
59. Petrini O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: *Microbial Ecology of Leaves* (eds. J.H. Andrews and S.S. Hirano). Springer-Verlag, New York, USA: 179-197.
60. Rajput k., Chanyal S. et Agrawal P.K. (2013). Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata* isolated from gymnosperm tree- cupressus

- torulosa d.don. world journal of pharmacy and pharmaceutical sciences, 5(7), 1034-1054.
61. Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S. et Deshpande V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 62, 597–635.
 62. Rnan k., Kour D., Sheikh I., Dhiman A., Neelam Y., Ajar NY., Ali AR., Karan S. et Anil KS. (2019). *Endophytic Fungi: Biodiversity, Ecological Significance, and Potential Industrial Applications on Recent Advancement in White Biotechnology through Fungi: Diversity and Enzymes Perspectives*, Galway, Ireland. 582.
 63. Rodriguez R., White J., Arnold A. et Redman R. (1999). Fungal endophytes : diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2),314–330. doi:10.1111/j.14698137.2009.02773.x
 64. Roupael Y., Colla G., Giordano M., Raimondi G., Pannico A., Di Stasio E., Cardarelli M., Bonini P. et de Pascale S. (2020). Endophytic fungi induce salt stress tolerance in greenhouse grown basil. de Pascale S See fewer *Acta Horticulturae*, 125-131.
 65. Saadallah K., Drevon JJ., Hajji M. et Abdelly C. (2021). Genotypic variability for tolerance to salinity of N₂-fixing common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Agronomie, EDP Sciences*, 21(6-7), 675-682.
 66. Saikkonen K., Wali P., Helander M. et Stanley H. (2004). Evolution of endophyte–plant symbioses. *Trends in plant science*, 9(6), 275- 280.
 67. Salleh A., Rahman N. et Basri M. (2006). *New lipases and proteases*. Edtioned Nova Publishers, ISBN 1600210686.
 68. Samson R.A., Noonim P., Meijer M., Houbraken J., Frisvad J.C. et Varga J. (2007). Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology*, 59,129–145. doi:10.3114/sim.2007.59.13
 69. Samson R.A., Visagie C.M., Houbraken J., Hong S.B., Hubka V., Klaassen A.C., Perrone G., Seifert K.A., Susca A., Tanney J.B., Varga J., Kocsubé S., Szigeti G., Yaguchi T. et Frisvad J.C. (2014). Phylogénie, identification et nomenclature du genre *Aspergillus*. *Études en mycologie*, 78, 141–173. doi:10.1016/j.simyco.2014.07.004
 70. Selim K., El Beih A., AbdEl-Rahman T. et El-Diwany. (2012). Biology of Endophytic Fungi, *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 2(1), 31– 82.
 71. Selmi K., Nagia M. et Ghwas D. (2016). *Endophytic Fungi Are Multifunctional Biosynthesizers: Ecological Role And Chemical Diversity, Characterization And Biocontrol*, New York, Evelyn Hughes, 163.

72. Shahid S., Zaman M. et Heng L. (2018). Introduction to Soil Salinity, Sodcity and Diagnostics Techniques. Guideline for Salinity Mitigation and Adaptation Using Nuclear and Relat Techniques, 1-42.
73. Shankar R., Upadhyay PK. Kumar M. (2021). Protease Enzymes: Highlights on Potential of Proteases as Therapeutics Agents, *Int. J. Pept. Res. Ther*, 27, 1281–1296.
74. Sieber T. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists. *fungal biology reviews*, 75- 89.
75. Sinsuwan S., Rodtong S. et Yongsawatdigul J. (2008). Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus sp.* SK33 isolated from fish sauce fermentation. 43(2), 185–192. doi:10.1016/j.procbio.2007.11.015
76. Souza P., Bittencourt M., Caprara C., De Freitas M., De Almeida R., Silveira D., Fonseca Y., Filho E., Junior A. et Magalhães P. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 337-346.
77. Stone J., Polishook J. et White J. (2012). Endophytic Fungi, *Encyclopedia of Science & Technology*. 242- 269. <http://dx.doi.org/10.13140/2.1.3835.2169>
78. Strobe G. (2003). Endophytes as sources of bioactive products, *Microbes and Infection*, 5(6), 535– 544.
79. Strobel G., Marguerite B., Castillo U. et Harper J. (2004). Produits naturels issus de micro-organismes endophytes, 67(2), 257–268. doi:10.1021/np030397v
80. Sudha V., Govindaraj R., Baskar k., Al-Dhabi N. Durairandiyan V. (2016). Biological properties of Endophytic Fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(0),1-7
81. Sunitha H.V., Nirmala D. et Srinivas C. (2013). Extracellular Enzymatic Activity of Endophytic Fungal Strains Isolated from Medicinal Plants. *World J. Agric. Sci*, 9 (1), 01-09.
82. Tarek H. (2021). Note sur le *Medicago arborea* sous stress salin. *Institut National de Recherche Forestiere*, 12(01), 26-31.
83. Tavano OL. Proteases. In R.C. Ray et C.M. Rosell eds. (2017). *Microbial Enzyme Technology in Food Applications.*: CRC Press, Taylor & Francis Group, 162-179.
84. Tavano OL., Murcia AB., Secundo F. et Fernandez-Lafuente F. (2018). *Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology*.
85. Uzma F., Murthy KN. et Chowdappa S. (2013). Diversity and extracellular enzyme activities of fungal endophytes isolated from medicinal plants of Western Ghats. *Karnataka egyptian journal of basic and applied sciences*, 3, 335–342.

86. Vermelho A.B., Meirelles M.N., Lopes A., Petinate S., Chaia A.A. et Branquinha M.H. (1996). Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91(6), 755–760. doi:10.1590/S0074-02761996000600020
87. Wu B., Wu L., Chen D., Yang Z. et Luo M. (2009). Purification and characterization of a novel fibrinolytic protease from *Fusarium sp.* CPCC 480097. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 36, 451–459.
88. Xie Y., Han S., Li X., Amombo E. et Fu J. (2017). Amelioration of salt stress on bermudagrass by the fungus *Aspergillus aculeatus*. *Molecular Plant - Microbe Interactions*, 30(3), 245-254.
89. Yan N., Marschner P., Cao W., Zuo C. et Qin W. (2015). Influence of salinity and water content on soil microorganisms. See fewer *International Soil and Water Conservation Research*, 3(4), 316-323.
90. Yu H., Zhang L., Li L., Zheng C., Guo L., Li W., Sun P. et Qin L. (2010). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*, 165(6), 437-449.
91. Zhang H.W., Song Y.C. et Tan R.X. (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, 23, 753-771.

Annexes

Annexes :**Annexe 01 :****Milieu PDA**

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

Milieu agar blanc

Agar.....	20 g
Eau distillée	1L

Milieu synthétique à base de gélatine

Gélatine	10 g
Extrait de viande.....	1,5 g
Peptone.....	5 g
NaCl.....	5 g
MgSO ₄	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
KCl.....	0,5 g
Agar.....	20 g
Eau distillée	1 L

Bleu de Coomassie

Bleu de coomassie.....	0,25 g
Méthanol.....	50 mL
Acide acétique	10 mL
Eau distillée.....	40 mL

Annexe 02 : les protocoles des dosages

a. Dosage des protéines

Réactifs

Solution A : Na_2CO_3 à 2% dans le NaOH (0,1N).

Solution B : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 1% dans l'eau distillée.

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

Solution M : 1 mL de solution C + 1 mL de solution B + 20 mL de solution A.

Réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/2^{ème}.

Protocole

Un mélange de 200 μL de l'échantillon protéique et 2 mL de la solution M est laissé reposer 10 à 15 min à température ambiante, ensuite 200 μL du réactif de Folin est ajouté. Après agitation vigoureuse, l'échantillon est incubé à température ambiante à l'obscurité pendant 45 min. L'absorbance est lue à 750 nm.

b. Dosage des activités enzymatiques

Réaction enzymatique

Le mélange réactionnel est préparé par addition de :

- 1 mL de l'extrait enzymatique est décongelé juste avant le dosage.
- 1,5 mL du tampon citrate - phosphate (0,2 M), pH 6,8
- 2,5 mL des trois substrats (solution de caséine, BSA et l'hémoglobine à 2,5% dans le citrate - phosphate à 0,2 M).

Après agitation, le mélange est incubé à 40°C au bain marie pendant 1 heure. La réaction est ensuite arrêtée par addition de 5 mL de TCA à 4%, ce qui va entraîner la précipitation des protéines non hydrolysées. Le mélange est laissé reposer 15 à 20 minutes, puis filtré sur papier Whatman n°1 pour récupérer les molécules solubles.

Un blanc est préparé de la même manière, sauf que le TCA est rajoute avant le substrat.

Protocole de dosage (la méthode d'Anson 1938)

- 0,5 mL du filtrat sont mélangés avec 2,5 mL de Na_2CO_3 à 2% dans le NaOH (0,1N)
- 0,25 mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/2ème après agitation et une incubation 15 min à température ambiante.
- Les mélanges sont bien agités et laissés reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant au moins 30 min.

L'absorbance de la coloration bleue développée est lue à 750

Annexe 03 : les courbes d'étalonnages

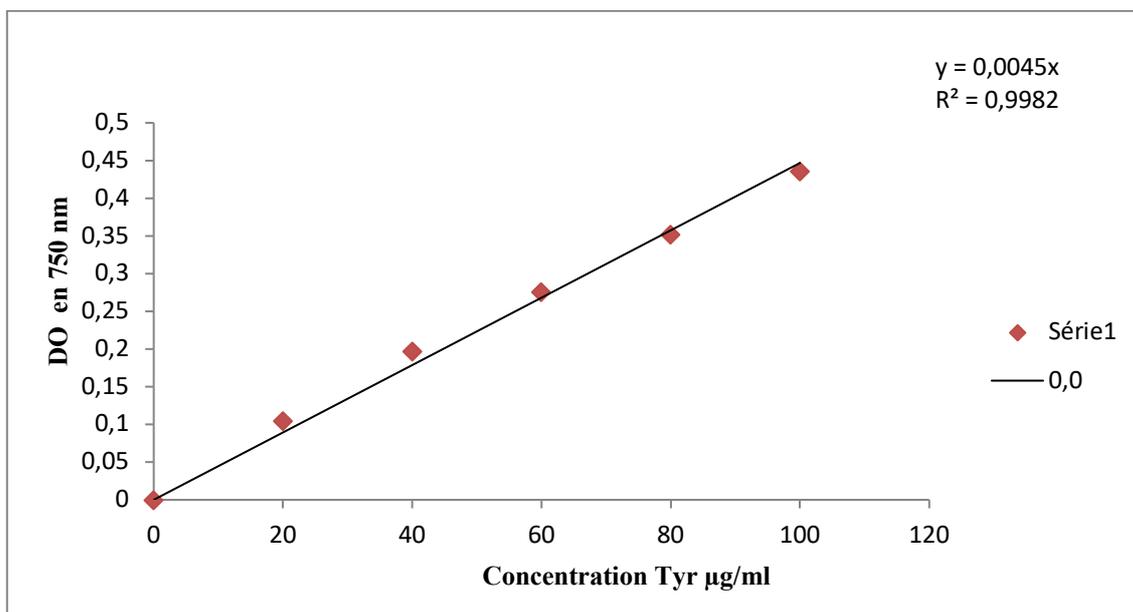


Figure 15 : La courbe d'étalonnage de la tyrosine

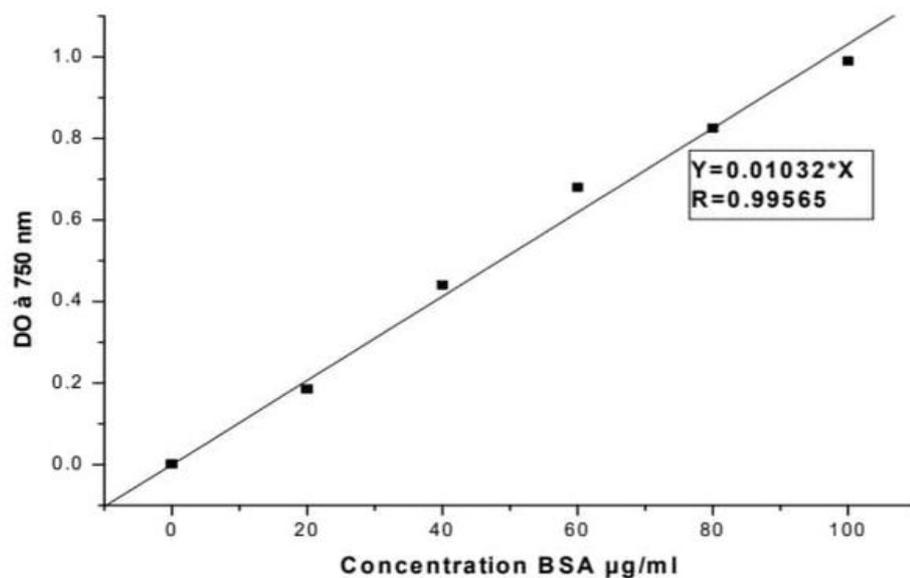


Figure 16 : La courbe d'étalonnage de la BSA.

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : BOUSSALIA Rania
ZITOUNI Nour El Houda

Impact du stress salin sur l'activité protéolytique d'*Aspergillus tubingensis*

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

Résumé

Ce travail, vise à étudier l'aptitude de l'endophyte *Aspergillus tubingensis* MH189391 à tolérer et à produire des protéases en conditions de stress salin. Afin d'atteindre cet objectif, une mise en évidence de l'activité protéolytique a été réalisée sur milieu gélosé en absence et en présence de 5% NaCl et additionnée de différentes sources de protéines étant la seule source de carbone et d'azote à savoir la caséine, l'albumine, l'hémoglobine, la BSA, le lait et le sang frais. La souche a montré une tolérance à la présence de 5% de NaCl, cette adaptation à cette concentration en sel s'est traduite par des zones de protéolyse plus importante par rapport au témoin avec des diamètres variants entre 17 et 54 mm. Cependant, la production des protéases par fermentation sur milieu synthétique à base de la gélatine en absence et en présence de 5% NaCl a révélé que les extraits enzymatiques endocellulaire et exocellulaire ont montré que 5% de NaCl stimule la synthèse de protéases. De plus, les protéases produites par *A. tubingensis* en présence de 5% NaCl ont présenté plus d'affinité pour la caséine avec des activités spécifiques de 14916,96 U/mg et de 3534,80 U/mg d'extrait endocellulaire et exocellulaire respectivement.

Mots-clés : stress salin, NaCl, endophyte fongique, *Aspergillus tubingensis*, protéases.

Laboratoires de recherche :

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

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

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

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