

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Science de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

N° d'ordre : 30/D3C/2020

N° de série : 03/MB/2020



Thèse de Doctorat
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle
Filière : Biotechnologie et Biologie de l'Environnement
Spécialité : Biotechnologie et Bioprocédés, Applications Mycologiques

Présentée par :

MEGHNOUS OUISSEM

Intitulé :

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

Soutenue le : **08/07/2020**

Membres du jury :

Président :	Pr. KACEM CHAOUICHE N.	Université des Frères Mentouri Constantine 1.
Directeur :	Pr. DEHIMAT L.	Université des Frères Mentouri Constantine 1.
Co-Directeur :	Pr. RACHED O.	ENSB Taoufik Khaznadar.
Examineurs :	Pr. SOUMATI B.	Université Badji Mokhtar Annaba.
	Pr. HAMIDECHI M.A.	Université des Frères Mentouri Constantine 1.
	Pr. AFRI-MEHENNAOUI F.Z.	Université des Frères Mentouri Constantine 1.

Année universitaire 2019/2020

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je remercie Dieu Le Tout Puissant, pour la volonté, la santé et la patience qu'il m'a donné durant toutes ces années d'étude, afin je puisse en arriver là. Oh ! Mon Seigneur, Tu m'as fait trébucher pour me permettre de mieux apprécier ta grandeur. « Gloire à Toi ! Nous n'avons de savoir que ce que Tu nous as appris. Certes c'est Toi l'Omniscient, le Sage » [Surate Al Baqarah versé : 32].

A l'issue de ce travail de recherche, je tiens tout particulièrement à remercier mon directeur de thèse, Mr. DEHIMAT Laid, Professeur et Doyen de la Faculté des Sciences Naturelles et de la Vie. Université des Frères Mentouri Constantine 1, pour avoir accepté de diriger avec beaucoup d'attention et de soin cette thèse. Et ma co-directrice de thèse, Mme. RACHED-MOSBAH Oualida, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie Touafik Khaznadar. Grâce à son appui moral, sa disponibilité exceptionnelle, sa bienveillance, et d'avoir prêté un intérêt constant au sujet de la thèse, j'ai pu acquérir les connaissances indispensables pour réaliser des recherches avec rigueur dans les années à venir. Je lui dois beaucoup pour le contenu du travail présenté, pour ses critiques constructives et son aide aux différentes entraves rencontrées, pour sa gentillesse, ses qualités humaines et scientifiques. Merci pour m'avoir laissé la liberté d'entreprendre et de me tromper. Mille fois merci Madame pour ces années où nous avons travaillé ensemble.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes vifs remerciements à Mme. MOSBAH Fawzia, qui m'a fait bénéficier de son savoir et de ses conseils éclairés afin de perfectionner ce travail, le plus grand mérite lui revient. Mille fois merci Madame.

Mes sincères remerciements vont également à Mr. DOUMAS Patrick, Chargé de Recherche à Inra Montpellier, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je le remercie pour son intérêt à mon travail, pour ses conseils et l'encadrement de haut niveau qu'il m'a offert. Qu'il trouve ici mes sincères grâces et remerciements.

Je tiens également à remercier Mme. AMADEH Souad, Professeur et Directrice du Laboratoire Biologie et Environnement, qu'elle me soit permis de lui exprimer ma profonde gratitude pour son aide à la réalisation des dosages biochimiques, qui m'a procuré tout les réactifs nécessaires avec beaucoup de générosité.

Je témoigne ma profonde gratitude et ma déférente considération à Mr. le Professeur KACEM CHAUCHE Nouredine, pour l'honneur qu'il me fait en daignant présider ce jury.

J'ai été séduite par votre simplicité, votre dévouement, votre esprit d'écoute et votre sens de l'humanisme

Je souhaite également adresser mes sincères remerciements à Madame et aux Messieurs les Professeurs les membres du Jury ; F.Z Afri-Mehannaoui, B. Soumati et M.A. Hamidechi qui ont accepté de sacrifier de leur temps pour juger ce travail. Qu'ils me permettent de leur exprimer mes sentiments les plus respectueux.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Mme. Ghioua Karima pour le temps qu'elle m'a accordé malgré ses occupations et les précieux conseils qu'elle m'a offerts. Qu'elle trouve ici ma sincère gratitude.

Je tiens aussi à adresser mes vifs remerciements à toute l'équipe du Laboratoire Biologie et Environnement et particulièrement Mounia pour sa précieuse collaboration, et Hichem pour sa sympathie et sa générosité.

Mes remerciements vont aussi à mes proches, sans leur compréhension pour mon manque de disponibilité à leur égard, et sans leur soutien moral, ce travail n'aurait pu être mené à bien. Pour finir, ce travail n'aurait pas été mené à terme sans les concessions et les encouragements de mes parents, mon frère et mes sœurs, sans oublier mes amis auxquels je dis tout simplement merci de tout mon cœur.

Dédicaces

Je dédie ce travail aux êtres les plus chers au monde :

*Mes parents Que DIEU le tout Puissant les protège, les bénisse et leur accorde
une longue vie.*

A mon cher et unique frère Abdel Djali

A sœurs Imene et Faïza et leurs familles

A mes amies Esma et Sarah

A tous mes oncles et toutes mes tantes

Aux cousins et cousines

A tous ceux qui me sont chers

Liste des abréviations

ANOVA : Analyse de la variance

APX : Ascorbate peroxydase

As : Arsenic

BLAST : Basic Local Aligement Search Tool

BSA : Bovine sérum albumine

CAT : Catalase

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

dNTP : Désoxyribonucléotides triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

EC : Enzyme commission

ETM : Eléments traces métalliques

FC : Fréquence de colonisation

FI : Fréquence d'isolement d'un individu

GSH : Glutathion réduit

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

ITS : Internal transcribed spacer

MDA : Malonyldialdehyde

MEGA : Molecular Evolutionary Genetics Analysis

MP-AES : Microwave Plasma-Atomic Emission Spectrometer

NCBI : National Center for Biotechnology Information

p : Probabilité

PCR : Réaction en chaîne par polymérase (de l'anglais Polymerase Chain Reaction)

PDA : Potatoes Dextrose Agar

POD : Peroxydase

r : Corrélation entre les variables

ROS : Reactive oxygen species

Sb : Antimoine

SEM : Standard error of the mean

SOD : Superoxyde dismutase

TAE : Tris-Acétate-EDTA

TBA : Acide thiobarbiturique

Liste des tableaux

- Tableau 1 :** Les critères symbiotiques utilisés pour caractériser les classes des mycoendophytes
- Tableau 2 :** Les différentes phases de la peroxydation lipidique en présence des ROS et leurs réactions chimiques
- Tableau 3 :** Principales espèces réactives de l'oxygène et radicaux libres impliqués dans les réactions d'oxydation de l'ADN
- Tableau 4 :** Teneurs en Sb et As dans le sol et les espèces végétales étudiées
- Tableau 5 :** Les différents couples d'amorces choisis pour l'amplification de l'ADN
- Tableau 6 :** Fréquence de colonisation (FC %) et fréquence d'isolement d'individus (FI) chez *Hedysarum pallidum* Desf et *Lygeum spartum* L.
- Tableau 7 :** Composition générale de la mycoflore endophyte détectée chez *H. pallidum* et *L. spartum*
- Tableau 8 :** Affiliations phylogénétiques des mycoendophytes résistants à Sb et As
- Tableau 9 :** Variations du pH du bouillon Sabouraud tamponné additionné de Sb après la croissance fongique
- Tableau 10 :** Variations du pH du bouillon Sabouraud tamponné additionné d'As après la croissance fongique
- Tableau 11 :** Matrice de corrélation de *Pearson* entre toutes les variables analysées et les concentrations de Sb dans le milieu de culture pour *A. tubingensis*
- Tableau 12 :** Matrice de corrélation de *Pearson* entre toutes les variables analysées et les concentrations d'As dans le milieu de culture pour *A. tubingensis*
- Tableau 13 :** Matrice de corrélation de *Pearson* entre toutes les variables analysées et les concentrations de Sb dans le milieu de culture pour *F. oxysporum*
- Tableau 14 :** Matrice de corrélation de *Pearson* entre toutes les variables analysées et les concentrations d'As dans le milieu de culture pour *F. oxysporum*

Liste des figures

- Figure 1 :** Les ROS induisent des dommages oxydatifs pour les lipides, les protéines et l'ADN
- Figure 2 :** Localisation géographique de la zone d'étude Ain Babouche
- Figure 3 :** Photographie des touffes d' *H. pallidum* Desf.
- Figure 4 :** Photographie des touffes de *L. spartum* L.
- Figure 5 :** Développement mycoendophytes
- Figure 6 :** Fréquence de colonisation (%) et Fréquence d'isolement d'individus des champignons endophytes chez *Hedysarum pallidum* Desf et *Lygeum sparum* L.
- Figure 7 :** Composition spécifique des mycotaxons endophytes détectés chez les deux espèces végétales
- Figure 8 :** Fréquences relatives de différents taxa de mycoendophytes isolés à partir des racines de d'*H. pallidum*
- Figure 9 :** Fréquences relatives de différents taxa de mycoendophytes isolés à partir des racines de *L. spartum*
- Figure 10 :** Distribution des CMI's d'antimoine et d'arsenic pour les 201 souches de mycoendophytes des deux plantes steppiques
- Figure 11 :** Sélection des mycoendophytes d'*H. pallidum* résistants à As et Sb
- Figure 12 :** Sélection des mycoendophytes de *L. spartum* résistants à As et Sb
- Figure 13 :** Caractères cultureux et morphologique du mycoendophyte résistant à l'antimoine
- Figure 14 :** Caractères cultureux et morphologiques du mycoendophyte résistant à l'arsenic
- Figure 15 :** Test confirmatif de l'efficacité des amorces spécifiques sur gel d'agarose 1,2%
- Figure 16 :** Discrimination primaire du mycoendophyte H2 avec les amorces spécifiques
- Figure 17 :** Arbre phylogénétique
- Figure 18 :** Poids sec d'*A. tubingensis* et *F. oxysporum* après 96h d'incubation sur bouillon Sabouraud supplémenté par différentes concentrations de Sb (III)
- Figure 19 :** Poids sec d'*A. tubingensis* et *F. oxysporum* après 96h d'incubation sur bouillon Sabouraud supplémenté par différentes concentrations de As III)
- Figure 20 :** Teneurs de Sb (III) accumulées par *A. tubingensis* et *F. oxysporum*
- Figure 21 :** Pourcentage d'élimination de Sb (III) par *A. tubingensis* et *F. oxysporum*
- Figure 22 :** Teneurs d'As (III) accumulées par *A. tubingensis* et *F. oxysporum*
- Figure 23 :** Pourcentage d'élimination d'As (III) par *A. tubingensis* et *F. oxysporum*
- Figure 24 :** Poids secs des mycéliums d'*A. tubingensis* et de *F. oxysporum*
- Figure 25 :** Teneur intracellulaire en H₂O₂ chez *A. tubingensis* et *F. oxysporum*
- Figure 26 :** Contenu en MDA chez *A. tubingensis* et *F. oxysporum*
- Figure 27 :** Teneur intracellulaire en proline chez *A. tubingensis* et *F. oxysporum*
- Figure 28 :** Activités de la CAT d'*Aspergillus tubingensis* et de *Fusarium oxysporum*
- Figure 29 :** Activités de la SOD d'*Aspergillus tubingensis* et de *Fusarium oxysporum*
- Figure 30 :** Activités de la POD d'*Aspergillus tubingensis* et de *Fusarium oxysporum*
- Figure 31 :** Activités de l'APX d'*Aspergillus tubingensis* et de *Fusarium oxysporum*

Tables des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Table des matières	
Introduction	1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 Les endophytes fongiques : Généralités, biodiversité et rôles dans l'écosystème	4
1.1 Généralités	4
1.2 Biodiversité des endophytes	5
1.3 Rôle des mycoendophytes	7
1.3.1 Endophytes en tant que décomposeurs saprophytes primaires	7
1.3.2 Endophytes en tant que mutualistes et agents pathogènes latents	8
1.3.3 Protection contre des microorganismes pathogènes	8
1.3.4 Tolérance au stress abiotique.....	8
1.3.5 Tolérance aux métaux lourds.....	8
Chapitre 2 Les métaux lourds dans l'environnement : Sources, toxicité et techniques de rémediation	10
2.1 Les métaux lourds	10
2.1.1 Origine de la pollution par les métaux lourds.....	11
2.1.2 Principaux métalloïdes et propriétés	11
2.1.2.1 Antimoine (Sb)	11
2.1.2.2 Arsenic (As).....	12
2.1.3 Effet toxique des métaux lourds et métalloïdes	13
2.2 Métaux lourds et stress oxydatif	13
2.2.1 Conséquences des ROS générés par la toxicité des métaux lourds	15
2.2.1.1 Peroxydation lipidique	15
2.2.1.2 Oxydation des protéines	16
2.2.1.3 Dommage de l'ADN	17
2.2.2 Techniques de remédiation.....	19

2.2.2.1	Approches physicochimiques	19
2.2.2.2	Phytoremédiation	19
2.2.2.3	Bioremédiation	21
2.3	Mécanismes de tolérance aux métaux lourds chez les champignons	23
2.3.1	Solubilisation du métal.....	23
2.3.2	Immobilisation du métal	24
2.3.2.1	Biosorption du métal.....	24
2.3.2.2	Bioaccumulation et séquestration intracellulaire	25
2.3.2.3	Précipitation de composés métalliques sur et /ou autour des hyphes.....	26
2.3.2.4	Biotransformation du métal.....	26
2.3.2.4.1	Oxydoréduction	27
2.3.2.4.2	Biométhylation.....	27
2.3.3	Mécanismes antioxydants	28
2.3.3.1	Antioxydants non-enzymatiques.....	28
2.3.3.1.1	Glutathion (GSH).....	28
2.3.3.1.2	Vitamines.....	29
2.3.3.1.3	Proline	30
2.3.3.2	Antioxydants enzymatiques.....	30
2.3.3.2.1	Superoxyde dismutase (SOD).....	31
2.3.3.2.2	Catalase (CAT).....	32
2.3.3.2.3	Peroxydases (POX).....	33
2.3.3.2.4	Glutathion peroxydases (GPx).....	34
2.3.3.2.5	Peroxyredoxines (PRXs)	34
2.3.3.2.6	Ascorbate peroxydase	34

Matériel et méthodes

1.	Objectif	36
2.	Zone d'étude	36
3.	Echantillonnage des plantes étudiées.....	38
4.	Description du matériel biologique.....	39
4.1	<i>Hedysarum pallidum</i> Desf.	39
4.2	<i>Lygeum spartum</i> L.....	40
5.	Analyses microbiologiques	41
5.1	Isolement et purification des mycoendophytes.....	41

5.2	Fréquence de colonisation (FC)	41
6.	Screening des mycoendophytes résistants à l'antimoine et l'arsenic	41
6.1	Identification des mycoendophytes	42
6.1.1	Les caractères cultureux	42
6.1.2	Les caractères morphologiques	42
6.1.3	Identification moléculaire des mycoendophytes	43
6.1.3.1	Isolement de l'ADN génomique	43
6.1.3.2	Choix des amorces par la PCR	43
6.1.3.3	Vérification des amplifiats par électrophorèse	45
6.1.3.4	Séquençage	45
6.1.3.5	Comparaison des séquences avec la banque informatique	45
6.1.3.6	Analyse phylogénétique et reconstruction d'arbre phylogénétique	45
7.	Tests <i>in vitro</i> de toxicité	46
8.	Méthodes de dosage des métalloïdes	46
8.1	Minéralisation par digestion acide au micro-ondes	46
8.2	Analyses au Spectroscopie d'Emission Atomique (MP-AES)	47
9.	Méthodes de dosage biochimique	47
9.1	Dosage du malonedialdéhyde (MDA)	48
9.2	Mesure de la teneur en H ₂ O ₂	48
9.3	Mesure de la teneur en proline intracellulaire	49
9.4	Dosage des enzymes antioxydantes et des protéines	49
9.4.1	Préparation des aliquotes	49
9.4.2	Catalase (CAT)	49
9.4.3	Superoxyde dismutase (SOD)	50
9.4.4	Peroxydase (POD)	50
9.4.5	Ascorbate peroxydase (APX)	50
9.4.6	Dosage des protéines	51
10.	Analyse statistique	51

Résultats et discussion

Chapitre 1 : Analyses microbiologiques	52
1. Composition spécifique de la mycoflore endophyte	52
2. Composition spécifique des isolats fongiques endophytes	54
3. Sélection des mycoendophytes résistants aux métalloïdes	66
4. Identification des mycoendophytes résistants à l'antimoine et l'arsenic	69

Chapitre 2 : Analyses toxicologiques	83
1. Impact de Sb et As sur la croissance des deux mycoendophytes.....	83
2. La bioaccumulation des métalloïdes par la biomasse active des mycoendophytes	85
Chapitre 3 : Analyses biochimiques	94
1. Effet de Sb et d'As sur le pH du milieu de culture	94
2. Effet de la toxicité de Sb et As sur la croissance des mycoendophytes	95
3. Effet de Sb et d'As sur les biomarqueurs non-enzymatiques	97
3.1 Teneur intracellulaire en H ₂ O ₂	97
3.2 Peroxydation lipidique.....	98
3.3 Contenu intracellulaire en proline	100
4. Effet de Sb et d'As sur les biomarqueurs enzymatiques	102
4.1 Catalase (CAT).....	102
4.2 Superoxyde dismutase (SOD).....	104
4.3 Peroxydase (POD).....	105
4.4 Ascorbate peroxydase (APX)	107
Conclusion	123
Références bibliographiques	126
Annexes	
Résumés	
Publication	

Introduction

Les métaux lourds et les métalloïdes font partie des ressources naturelles utilisées dans plusieurs applications industrielles, agricoles et domestiques. Cependant, ils agissent conjointement en tant que polluants, ce qui peut être très toxique pour de nombreuses formes de vie et entraîner divers problèmes environnementaux. Contrairement à certains polluants organiques, les métaux lourds sont biopersistants et présentent une toxicité même à faible concentration (Fu et Wang, 2011 ; Rose et Devi, 2015 ; 2018).

L'arsenic (As) et l'antimoine (Sb) sont libérés *via* des processus naturels et des activités humaines, bien que leurs concentrations dans les systèmes naturels soient généralement faibles (environ 15 mg kg⁻¹ As et <1 mg kg⁻¹ Sb dans les sols), ils sont considérés comme des polluants toxiques qui suscitent le plus d'intérêt pour l'Union Européenne et l'Agence Américaine de protection de l'environnement (Filella et al., 2002 ; Benhamdi et al., 2014 ; Kataoka et al., 2018).

De ce fait, la reconnaissance du danger des métaux lourds a entraîné le développement de plusieurs technologies de dépollution des sites concernés, dont la bioremédiation, par le biais de l'utilisation de plantes ou de microorganismes (Tanaka et al., 2006 ; Kavamura et al., 2010), entre autres les mycoendophytes d'où l'appellation mycoremédiation. Ils forment un groupe polyphylétique très diversifié, regroupant principalement les espèces appartenant au phylum Ascomycota.

La littérature scientifique sur les champignons endophytes se focalise en particulier sur deux aspects : pharmacologique par la capacité de produire de nombreuses molécules bioactives et écologique par leur impact sur la diversité végétale et le fonctionnement des écosystèmes.

Les champignons sont un meilleur choix en tant que bioremédiateur en raison de leur grande tolérance à la toxicité des métaux lourds, de leur taux de croissance élevé et de leurs excellentes propriétés liantes pour les métaux (*metal binding*) (Gadd 1993). Ils peuvent être facilement et économiquement cultivés en grande quantité en raison de leur cycle de multiplication court et leur facilité de modification morphologique et génétique (Fu et Wang, 2011 ; Dhankhar et Hooda, 2011). Le potentiel de bioremédiation des métaux lourds de différentes espèces de champignons a été rapporté par de nombreux auteurs (Ahluwalia et Goyal, 2007 ; Wang et Chen, 2009 ; Abbas et al., 2014).

Au niveau cellulaire, les métaux lourds et les métalloïdes ont été rapportés pour:

- ✓ générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et provoquer un stress oxydant,
- ✓ causer des dommages à l'ADN et / ou altérer les mécanismes de réparation de l'ADN,
- ✓ interférer avec la fonction membranaire et l'assimilation des nutriments
- ✓ et perturber la fonction et l'activité des protéines (Wysocki et al., 2010 ; Lemire et al., 2013).

En réponse aux ROS nuisibles induites par la présence des métaux lourds, les endophytes fongiques ont développé de multiples mécanismes de défense par la production des composés antioxydants enzymatiques et non enzymatiques pour éliminer ces ROS et protéger leurs composants cellulaires (Winyard et al., 2005) et ceux de leur plante hôte (Tanaka et al., 2006).

Dans la région du Djebel Hamimat, une exploitation minière abandonnée a généré d'importantes quantités de déblais contenant divers métaux toxiques, principalement l'antimoine et l'arsenic dont les concentrations atteignent 62000 mg kg^{-1} et 23000 mg kg^{-1} respectivement (Bentellis et al., 2014 et Benhamdi et al., 2014). Dans cette région, l'analyse chimique de deux plantes métallophiles, *Hedysarum pallidum* Desf., et *Lygeum spartum* L par Benhamdi et al. (2014) a montré que celles-ci accumulaient jusqu'à 263 mg kg^{-1} de Sb et 72 mg kg^{-1} d'As dans leurs parties aériennes, et 183 mg kg^{-1} de Sb et 6 mg kg^{-1} d'As dans leurs parties souterraines.

Ces mêmes auteurs ont montré que ces espèces présentaient d'importantes activités enzymatiques antioxydantes et qu'elles avaient développé des mécanismes moléculaires de défense contre le stress oxydatif généré par la pollution métallique. L'adaptation de ces plantes à la toxicité du milieu pourrait être liée à la présence d'une mycoflore au sein de leurs racines qui seraient l'un des facteurs influençant leurs capacités d'accumulation ou de restriction de l'antimoine et de l'arsenic.

De ce fait, le présent travail a pour objectif de mettre en évidence l'existence au sein des racines d'*H. pallidum* et *L. spartum*, des espèces fongiques présentant une importante résistance / tolérance à l'antimoine et l'arsenic, qui auraient acquis des capacités à piéger les

ROS produits par la toxicité de Sb et d'As et de restreindre ou de permettre l'accumulation des éléments toxiques par les plantes hôtes tout en les protégeant contre le stress oxydatif. Ceci afin de comprendre la stratégie cellulaire de la tolérance à la toxicité induite par l'antimoine et l'arsenic et évaluer la possibilité d'application des mycoendophytes isolés pour la bioremédiation des environnements contaminés par ces métalloïdes.

La première partie du présent travail est consacrée à la description de données bibliographiques relatives aux mycoendophytes, à leur biodiversité et leur rôle dans l'écosystème, et aussi aux métaux lourds, leurs sources, toxicité et techniques de remédiation.

La seconde partie, consacrée à l'étude expérimentale, est structurée en trois chapitres composés, chacun, d'une partie décrivant le matériel et les différentes techniques utilisées, et d'une autre partie exposant, discutant et comparant les résultats obtenus.

- ✓ Le chapitre 1 concerne les analyses microbiologiques, commençant par l'isolement de mycoendophytes à partir des racines de deux plantes steppiques accumulatrices de métalloïdes, puis screening de mycoendophytes résistants / tolérants à As et Sb, et enfin une identification par voix moléculaire des mycoendophytes sélectionnés.
- ✓ Le chapitre 2 décrit les analyses toxicologiques qui consistent à mettre en évidence, *in vitro* les mécanismes cellulaires de résistance / tolérances des mycoendophytes résistants, par le dosage de l'arsenic et de l'antimoine par le MP-AES.
- ✓ Le chapitre 3 correspond aux analyses biochimiques qui consistent à évaluer *in vitro* le potentiel de ces mycoendophytes à lutter contre le stress oxydatif généré par l'As et le Sb.

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

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 Les endophytes fongiques : Généralités, biodiversité et leurs rôles dans l'écosystème

1.1 Généralités

Le terme « endophyte » est composé de deux mots grecs, « endon » signifiant au sein et « phyton » désignant plante (Staniek et al., 2008) et désigne tout organisme colonisant asymptomatiquement un végétal.

Le mot endophyte, à l'origine introduit par de Bary (1866), se réfère à tous les organismes qui se reproduisent à l'intérieur des tissus végétaux, distinctes des épiphytes qui vivent sur la surface des plantes. Carroll (1986) a défini les endophytes comme des mutualistes qui colonisent les parties aériennes des tissus vivants des plantes et ne causent pas des symptômes de maladie, à partir desquelles les mycètes pathogènes et les mycorrhizes sont exclus.

Petrini (1991) a proposé un élargissement de la définition de Carroll pour inclure tous les organismes vivants dans les organes des végétaux qui, à un certain moment de leur vie, peuvent coloniser les tissus végétaux internes sans causer de dommage apparent à l'hôte. Par conséquent, les agents pathogènes latents connus pour vivre sans manifester de symptômes à l'intérieur des tissus hôtes qui ont une phase épiphyte dans leur cycle de vie, sont également des endophytes.

Le concept d'endophyte a été défini de plusieurs manières mais la définition de Petrini (1991) a été la plus utilisée généralement dans les études des endophytes. Petrini (1991) a défini les endophytes comme étant tous les microorganismes vivant dans les organes végétaux internes à un moment de leur vie, qui peuvent coloniser les tissus végétaux internes sans causer de dommages apparents chez la plante hôte (Hyde et Soyong, 2008).

Les champignons endophytes forment un groupe polyphylétique très diversifié, regroupent principalement des espèces appartenant au phylum Ascomycota ou groupe des champignons mitosporiques, ainsi que de certains taxons des Basidiomycota, Zygomycota et Oomycota (Guo, 2001) qui peuvent produire diverses substances bioactives (Aly et al., 2010 ; Xu et al., 2010 ; Liu et al., 2011 ; Tejesvi et al., 2011) et promouvoir la croissance de l'hôte et la résistance aux stress environnementaux (Saikkonen et al., 2010).

Toutes les plantes dans les écosystèmes naturels, semblent établir des relations avec des champignons endophytes en raison de leurs ubiquité (Krings et al., 2007) et ils ont été largement étudiés dans les différentes zones géographiques et climatiques (Sun et Guo, 2012).

À la différence des champignons mycorhiziens qui colonisent les racines des plantes et se développent dans la rhizosphère, les endophytes résident entièrement dans les tissus végétaux et peuvent se développer dans les racines, les tiges et les feuilles, émergeant pour sporuler dans la plante.

1.2 Biodiversité des endophytes

Les champignons endophytes symbiotiques peuvent avoir des effets profonds sur la phytoécologie, la forme physiologique et l'évolution. Divers groupes de ces microorganismes peuvent produire de nombreuses molécules bioactives (Brundrett, 2006 ; Maheshwari, 2006).

Généralement deux groupes importants de myccoendophytes reflètent des différences dans l'apparenté évolutionnaire, la taxonomie des plantes hôtes et des fonctions écologiques : les endophytes clavicipitaceae (C-endophytes) et les endophytes non-clavicipitaceae (NC-endophytes).

La classe 1 des endophytes représente un nombre restreint d'espèces clavicipitaceae phylogénétiquement apparentées, qui sont fastidieuses dans la culture et limitées à certaines graminées fraîches des saisons chaudes (Jalgaonwala et al., 2011). La transmission des endophytes de la classe 1 est principalement verticale, avec les plantes maternelles, par la propagation du champignon à la descendance *via* les infections des graines (Saikkonen et al., 2010). Les avantages conférés par ces mycètes semblent dépendre des espèces hôtes, du génotype de l'hôte et des conditions environnementales (Faeth et al., 2006).

Les chercheurs ont proposé que les C-endophytes soient des mutualistes défensifs des plantes hôtes et cette hypothèse est largement admise dans l'évolution, l'écologie et la physiologie des endophytes (Koulman et al., 2007).

Synthèse bibliographique

Tableau 1 : Les critères symbiotiques utilisés pour caractériser les classes des mycoendophytes (Sénéquier-Crozet et Canard, 2016)

Criteria	Clavicipitaceus		Non-clavicipitaceus	
	Class 1	Class 2	Class 3	Class 4
Host range	Narrow	Broad	Broad	Broad
Tissue(s) colonized	Shoot and rhizome	Shoot, root and rhizome	Shoot	Root
<i>In planta</i> colonisation	Extensive	Extensive	Limited	Extensive
<i>In planta</i> biodiversity	Low	Low	High	Unknown
Transmission	Vertical and horizontal	Vertical and horizontal	Horizontal	Horizontal
Fitness benefits*	NHA	NHA and HA	NHA	NHA

*Nonhabitat-adapted (NHA) benefits such as drought tolerance and growth enhancement are common among endophytes regardless of habitat of origin. Habitat-adapted (HA) benefits result from habitat-specific selective pressures such as pH, temperature and salinity

Les endophytes non-clavicipitaceae (NC-endophytes) peuvent être récupérés des tissus asymptomatiques des plantes non vasculaires, des fougères, des alliés, des conifères et des angiospermes. Cependant, les NC-endophytes sont des mycètes fortement diversifiés qui représentent au moins trois groupes fonctionnels distincts basés sur un ensemble de caractéristiques de leur cycle de vie et de leur importance écologique. Typiquement, ces endophytes se reproduisent dans les jeunes plantules où ils forment des infections intercellulaires systémiques (Rodriguez et al., 2009).

Les NC-endophytes peuvent être différenciés en trois classes fonctionnelles basées sur des modèles de colonisation de la plante hôte, sur le mécanisme de la transmission entre les générations hôtes, dans les niveaux de biodiversité *in planta*, et sur la fonction écologique (Tableau 1). Bien que les trois classes aient de larges gammes d'hôtes, la classe 2 des NC-endophytes peut se développer dans les deux parties, racinaire et aérienne. En revanche, les NC-endophytes des classes 3 et 4 sont limités aux tissus de surface et aux racines respectivement.

La classe 2 des endophytes (NC-endophytes) comporte une diversité d'espèces appartenant à l'embranchement Ascomycota ou Basidiomycota. Ces endophytes sont distincts des autres NC-endophytes car en général ils colonisent les racines, les tiges et les feuilles ; sont capables de former de nombreuses infections dans la plante, sont transmis par l'intermédiaire des graines et / ou des rhizomes. Ils sont peu abondants dans la rhizosphère, et ont généralement des fréquences d'infection élevées (90-100%) dans les plantes qui poussent dans des conditions de stress (Rodriguez et al., 2008).

Les NC-endophytes de la classe 3 se distinguent sur la base de leur occurrence principalement ou exclusivement dans les tissus aériens, la transmission horizontale et la formation des infections très localisées. Cette classe comprend divers champignons endophytes associés aux feuilles d'arbres tropicaux (Arnold et al., 2000 ; Gamboa et Bayman, 2001), ainsi que divers tissus aériens des plantes non vasculaires, des plantes sans graines vasculaires, les conifères, les angiospermes ligneuses et les herbacées dans les biomes (Davis et al., 2003 ; 2009).

Les NC-endophytes de la classe 4 sont des endophytes bruns cloisonnés (septés) ou DSE (*Dark Septate Endophytes*) restreint pour les racines des plantes. Ce sont généralement des mycètes appartenant à la classe des Ascomycetes, qui ont soit des conidies soit des mycéliums stériles qui forment des structures mélanisées comme les hyphes inter et intracellulaires, et les microsclérotés dans les racines. On trouve cette classe d'endophytes dans les plantes hôtes non-mycorhisées des zones antarctiques, arctiques, alpestres, subalpines, tempérées et des écosystèmes tropicaux (Jumpponen, 2001).

1.3 Rôle des mycoendophytes

Les endophytes sont impliqués pour la diminution des herbivores, l'augmentation de la résistance à la sécheresse, l'augmentation de la résistance aux maladies et l'amélioration de la croissance des plantes. Ceci est dû en partie à la synthèse de certains types de régulateurs de croissance (hormones) (Sieber, 2007). Leur large distribution et leur taux de colonisation élevé des tissus végétaux dans tous les écosystèmes suggèrent leur rôle écologique primordial.

1.3.1 Endophytes en tant que décomposeurs saprophytes primaires

Plusieurs études récentes ont exploré le rôle des endophytes en tant que saprophytes. Il semble probable que certains (ou plusieurs) saprophytes proviennent des endophytes (Hyde et al., 2007).

Plusieurs études fournissent des preuves qui accèdent que la spécificité des saprophytes aux plantes hôtes dépend des endophytes, tandis que d'autres indiquent que les composants de l'hôte peuvent réguler les endophytes (Paulus et al., 2006).

Quelle que soit la raison, il est clair que de nombreux endophytes spécifiques des feuilles (et tissus ligneux) sont des saprophytes des genres ou familles d'hôtes spécifiques,

mais cette spécificité doit dépendre de facteurs tels que la colonisation initiale des endophytes et / ou des substances sécrétées dans les feuilles et les tiges (Paulus et al., 2006 ; Arnold, 2007 ; Hyde et al., 2007).

1.3.2 Endophytes en tant que mutualistes et agents pathogènes latents

Certains endophytes sont connus pour être des agents pathogènes latents (Hyde et al., 2007). Sieber (2007) déclare que ces endophytes pathogènes survivent avec leurs hôtes et ne sont pas très virulents. Ces agents pathogènes doivent à un moment donné sporuler lorsque les feuilles sont sénescents, ou quand les plantes sont stressées ou lorsqu'elles produisent des fruits qui finiront par pourrir.

1.3.3 Protection contre des microorganismes pathogènes

Les endophytes fongiques sont connus pour être une source riche de nouvelles substances antimicrobiennes. Les plantes associées aux endophytes produisent quelques métabolites qui induisent la résistance. Il est constaté que la plante symbiotique active le système de défense plus rapidement que les plantes non symbiotiques, après une attaque des agents pathogènes (Jalgaonwala et al., 2011).

1.3.4 Tolérance au stress abiotique

Les chercheurs ont prouvé que certains mycoendophytes protègent leur plantes hôtes contre les états de sécheresse (Clay et al., 2002), également leur permettent la tolérance au stress salin (Waller et al., 2005), et aussi augmentent la tolérance thermique dans leur hôte. Donc on peut dire que les endophytes agissent en tant que déclencheurs biologiques pour activer la réponse au stress plus rapidement et plus fortement que les plantes non symbiotiques (Redman et al., 2001).

1.3.5 Tolérance aux métaux lourds

De nombreuses études démontrent la résistance des souches fongiques et bactériennes endophytes aux métaux lourds : Deng et al. (2011) ont étudié la résistance d'une souche fongique endophyte isolée des racines de *Brassica chinensis*, *Mucor sp. CBRF59* au cadmium et au plomb. Cet isolat tolère 5 mM et 10 mM de Cd et Pb respectivement, la capacité maximale de biosorption du cadmium de cet isolat endophyte était de 108 mg g⁻¹, alors que la capacité de bioaccumulation était de 173 mg g⁻¹ dans les mêmes conditions. Tandis que la

capacité de bioaccumulation de *CBRF59* au plomb est sensiblement inférieure à celle de la capacité de biosorption des concentrations initiales en plomb.

De plus, le même auteur en (2014) a étudié le potentiel d'une autre souche fongique endophyte *Lasiodiplodia sp. MXSF31*, isolée des tiges de *Portulaca oleracea* poussant dans des sols contaminés par les métaux lourds pour détoxifier l'eau et les sols contaminés. La souche *Lasiodiplodia sp* résiste à 10 mM Zn, 3 mM Cd et 3 mM Pb. La capacité de la biomasse active du mycoendophyte test à éliminer le Cd, le Pb et le Zn est meilleure que celle de la biomasse morte $4,6 \times 10^4$; $5,6 \times 10^5$ et $7,0 \times 10^4$ mg Kg⁻¹, respectivement.

Par ailleurs, Xiao et al. (2010) ont isolé une souche fongique endophyte (*EF*) *Microsphaeropsis sp. LSE10*, à partir des racines d'une plante hyperaccumulatrice de cadmium *Solanum nigrum L* pour l'employer en tant que biosorbant pour la biosorption du cadmium d'une solution aqueuse. Les résultats ont montré que la capacité maximale de biosorption était de 247,5 mg/g (2,2 mmol/g) ce qui était beaucoup plus élevé que ceux d'autres biosorbants, y compris le charbon actif. Les groupes carboxyliques, aminés, de sulfonate et d'hydroxyle de la souche *EF LSE10* étaient responsables de la biosorption du cadmium.

Ceci confirme que les mycoendophytes issus d'un hôte hyperaccumulateur pourraient constituer des ressources potentielles en biosorbant hautement efficace pour la biosorption des métaux lourds et par conséquent la bioremédiation des environnements contaminés par les métaux lourds.

Chapitre 2 Les métaux lourds dans l'environnement : Sources, toxicité et techniques de rémédiation

2.1 Les métaux lourds

Les métaux lourds sont définis par Miquel (2001), comme étant des éléments métalliques naturels, métaux ou, dans certains cas, métalloïdes, caractérisés par une masse volumique élevée, supérieure à 5g/cm^3 . Ils sont non dégradables et existent sous différentes formes inorganiques et organiques, présents dans tous les compartiments de l'environnement, mais en général en quantité très faible.

L'appellation « métaux lourds » est une appellation courante qui n'a ni fondement scientifique, ni appellation juridique. La classification des métaux lourds est d'ailleurs souvent discutée car certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement « lourds » (le zinc), tandis que certains éléments toxiques ne sont pas tous des métaux (l'arsenic par exemple). Pour ces différentes raisons, la plupart des scientifiques préfèrent à l'appellation métaux lourds, l'appellation « éléments en traces métalliques » -ETM- ou, par extension, « éléments traces ».

Certains métaux lourds, tels que Fe, Cu, et Zn sont des oligo-éléments essentiels, mais d'autres, tels que Cd et Pb, n'ont aucune fonction biologique bénéfique et sont toxiques, même en très faibles quantités (Ahmed et al., 2011).

Certains éléments non-métaux tels que B, Si, Ge, As, Sb, Te et At qui ont l'aspect et / ou certaines propriétés des métaux, mais se comportent chimiquement comme des non-métaux, ont été parfois inclus dans le groupe « métaux lourds ». Ceci est maintenant considéré comme trop imprécis et ils sont appelés « métalloïdes » pour les distinguer des métaux lourds (Alloway et al., 2013).

En raison du caractère non biodégradable et biopersistant des métaux lourds, contrairement à certains polluants organiques, la contamination des sols par les éléments métalliques cause un risque significatif pour la santé écologique et publique en raison de leurs effets toxiques et de leur capacité à s'accumuler dans les chaînes alimentaires terrestres et aquatiques (Ahmed et al., 2011).

2.1.1 Origine de la pollution par les métaux lourds

La contamination des sols par les métaux lourds présente un intérêt important, parce qu'ils ne peuvent pas être dégradés comme la plupart des polluants organiques et ils s'accumulent dans les chaînes alimentaires terrestres, aquatiques et marines (Smejkalova et al., 2003).

L'origine des métaux peut être très variée. Les contaminations naturelles résultent des éruptions volcaniques et des affleurements des roches-mère, dont l'altération entraîne la libération des éléments métalliques dans le sol (Friedland, 1990). La concentration naturelle de ces métaux varie selon la nature de la roche, sa localisation et son âge (Zhang et al., 2009).

Cependant, la source majeure de la contamination a une origine anthropique. Les principaux types de pollutions anthropiques sont : les activités agricoles et industrielles telles que l'application à long terme des boues d'épuration urbaines ; des activités telles que l'élimination et l'incinération des déchets ; l'exploitation minière et la combustion des carburants (Khan, 2005). Ces sources provoquent l'accumulation de métaux et de métalloïdes dans les sols et constituent une menace pour la sécurité alimentaire et la santé publique en raison du transfert des métaux sol-plante (Ahmed et al., 2011).

Ces métaux provoquent des effets néfastes sur les écosystèmes aquatiques et terrestres et sur la santé humaine en raison de leur mobilité et de leur solubilité qui déterminent leur spéciation (Kabata-Pendias, 1992 ; Del Val et al., 1999).

2.1.2 Principaux métalloïdes et propriétés

2.1.2.1 Antimoine (Sb)

L'antimoine, de symbole Sb (issu de l'abréviation de son nom latin *stibium*), est également un métalloïde. De ce fait, il appartient également au groupe 15 de la classification périodique des éléments de Mendeleïev et fait partie de la famille des pnictogènes (c'est à dire la famille qui regroupe les éléments de la 15^{ème} colonne de la table périodique des éléments) tout comme l'arsenic, avec le numéro atomique 51 et la masse atomique 121,760 g/mol (Jana, 2009). Il peut exister sous une série d'états d'oxydation (-III, 0, III, V), mais il est principalement trouvé sous deux états d'oxydation (III et V) dans l'environnement et les échantillons biologiques et géochimiques (Filella et al., 2002).

Les composés trivalents d'antimoine exercent une toxicité aiguë dix fois plus élevée que les formes d'antimoine pentavalentes (Krachler, 2000 ; 2001).

L'antimoine est un métalloïde de couleur gris métallique, un élément dont l'abondance naturelle est faible, environ 0,2 µg/g dans l'écorce terrestre et 1 µg/g dans les sols, hors des zones polluées. Cet élément est répandu dans l'environnement par la combustion du charbon, les activités minières ou métallurgiques (Gebel et al., 1998).

Il est employé dans l'industrie en céramique et en plastique ; quelques composés organiques d'antimoine sont utilisés dans la médecine (Bentley et al., 2002). L'antimoine est un analogue chimique de l'arsenic avec une toxicité similaire. C'est un élément non essentiel pour les végétaux. Il est plutôt peu mobile dans les sols car il est associé à la phase résiduelle et aux oxydes de Fe et Al (He, 2007).

Le mécanisme de toxicité de l'antimoine semble inclure des interactions avec les groupes thiol fonctionnels de glutathion et des protéines (Murciego et al., 2007).

2.1.2.2 Arsenic (As)

L'arsenic, est dérivé du vieux mot persan « *zarnikh* », qui signifie l'orpiment jaune, de symbole As, est un métalloïde appartenant au groupe 15 (ou VA) de la classification périodique des éléments de Mendeleïev, avec le numéro atomique 33 et la masse atomique 74,9216 g/mol (Rensing et al., 2009).

L'arsenic est un élément ubiquitaire, le plus abondant dans la croûte terrestre et potentiellement toxique dans l'environnement. Sa mobilité et sa biodisponibilité sont influencées non seulement par des facteurs abiotiques (Sadiq, 1997), mais également par des microorganismes, particulièrement les mycètes, les bactéries et les algues (Gadd, 1993). Les processus microbiens généraux affectant le comportement d'arsenic dans les sols, les sédiments et les eaux sont la biosorption et la biovolatilization (Cernanskys et al., 2007).

Comme d'autres métalloïdes, l'As a des propriétés de semi-conducteur et se produit dans la nature dans divers états d'oxydation comprenant -III (arsine), 0 (arsenic natif), +III (arsenite) et +V (arsenate).

C'est un élément de transition dont les propriétés physico-chimiques sont intermédiaires entre celles des métaux et celles des non-métaux : en solution, l'arsenic se rapproche des non-métaux en formant des anions. En revanche, sa conductivité électronique et thermique le rapproche des métaux (Jana, 2009).

Dans des concentrations très faibles, l'arsenic semble être essentiel pour les animaux (Uthus, 1992) et bénéfiques pour les plantes (Evans et al., 2005). Or, l'As est reconnu pour ses effets toxiques dans l'environnement.

L'industrie métallurgique du cuivre, du plomb, du zinc et de l'or rejettent des quantités énormes d'arsenic dans l'environnement. D'autres émissions proviennent de la combustion mal maîtrisée de charbon. En agriculture, l'arsenic entrainait il y a encore peu de temps, dans la composition de nombreux produits destinés au traitement du bois, ou à l'élaboration de produits phytosanitaires comme les fongicides, insecticides, herbicides et défoliants (Deuneux-Mustin et al., 2003).

2.1.3 Effet toxique des métaux lourds et métalloïdes

L'absorption en excès des éléments toxiques entraîne, dans la majorité des cas, un dysfonctionnement des organismes, en perturbant le fonctionnement de systèmes enzymatiques dans lesquels ils n'interviennent habituellement pas. Cette perturbation est due à la forte affinité qu'ils possèdent, par rapport aux éléments dit non essentiels.

Les éléments toxiques peuvent entraîner : des altérations de la structure des acides nucléiques et des protéines ; une inhibition des réactions enzymatiques impliquées dans diverses fonctions métaboliques et des modifications de la perméabilité membranaire. De plus, leur toxicité peut être liée à une carence secondaire d'un élément essentiel, causée par l'excès de l'élément toxique (inhibition compétitive) (Deuneux-Mustin et al., 2003).

2.2 Métaux lourds et stress oxydatif

De nombreuses études ont montré que les métaux lourds présentent la capacité de produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS ou EROs), générant un stress oxydatif. Les ROS sont principalement l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^{\cdot}). Les ROS peuvent endommager les macromolécules cellulaires, conduisant à l'oxydation des protéines, la peroxydation lipidique

et des dommages à l'ADN (Halliwell et Gutteridge, 1984). Les cofacteurs métalliques tels que Fe, Mg et Zn peuvent subir des réactions redox-actifs, tandis que As, Cd, Hg, et Sb sont des métaux redox-inactifs. La formation des ROS induite par le métal peut se produire par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes.

Les réactions de Fenton ou Haber-Weiss sont catalysées par des métaux redox-actifs et génèrent le radical très réactif hydroxyle de l' H_2O_2 et le substrat superoxyde. Dans la réaction de Fenton, le peroxyde est décomposé en un ion hydroxyde et un radical libre hydroxyle. Le radical libre hydroxyle est l'espèce primaire oxydante et peut être utilisé pour oxyder et briser des molécules organiques. La réaction Haber-Weiss génère des radicaux hydroxyles à partir du peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde (Halliwell et Gutteridge, 1999).

Les métaux redox-actifs peuvent induire un stress oxydatif en inhibant les enzymes spécifiques, en épuisant le contenu antioxydant ou d'autres mécanismes indirects (Stohs et Bagchi, 1995 ; Ercal et al., 2001 ; Beyersmann et Hartwig, 2008). Par exemple, les métaux redox-actifs peuvent perturber le métabolisme intracellulaire du Fe, ce qui conduit à des niveaux élevés en Fe libre dans la cellule, ce qui pourrait perturber les réactions de type Fenton et par conséquent des niveaux élevés en ROS (Kitchin et Wallace, 2008).

Un exemple de l'effet de métaux redox-inactifs sur les contenus antioxydants est l'épuisement du glutathion (GSH), qui est le principal antioxydant dans les cellules (Stohs et Bagchi, 1995). L'épuisement du GSH influencerait le système redox et endommagerait l'activité des enzymes GSH-dépendantes tels les glutathion peroxydases, la glutathion-S-transférase et les glutarédoxines, affectant de ce fait de nombreux processus cellulaires (Wysocki et Tamas, 2010).

Chez les champignons ectomycorhiziens *Paxillus involutus*, Jacob et al. (2001) ont émis l'hypothèse que le Cd, bien qu'il soit un métal redox-inactif, a induit un stress oxydatif en modifiant l'équilibre redox en thiol cellulaire.

2.2.1 Conséquences des ROS générés par la toxicité des métaux lourds

La production et l'élimination des ROS doivent être strictement contrôlées afin d'éviter le stress oxydatif. Lorsque le niveau des ROS dépasse les mécanismes de défense, une cellule est en état de "stress oxydatif". Cependant, l'équilibre entre la production et le balayage des ROS est perturbé dans un certain nombre de conditions stressantes comme la salinité, la sécheresse, la lumière élevée, et la toxicité due aux métaux. Le taux élevé des ROS peut causer des dommages à des biomolécules telles que les lipides, les protéines et l'ADN (Figure 1). Ces réactions peuvent modifier les propriétés intrinsèques de la membrane, telles que la fluidité, le transport ionique, la perte de l'activité enzymatique, la réticulation des protéines, l'inhibition de la synthèse protéique, et les lésions de l'ADN, entraînant finalement la mort cellulaire (Khouja, 2011).

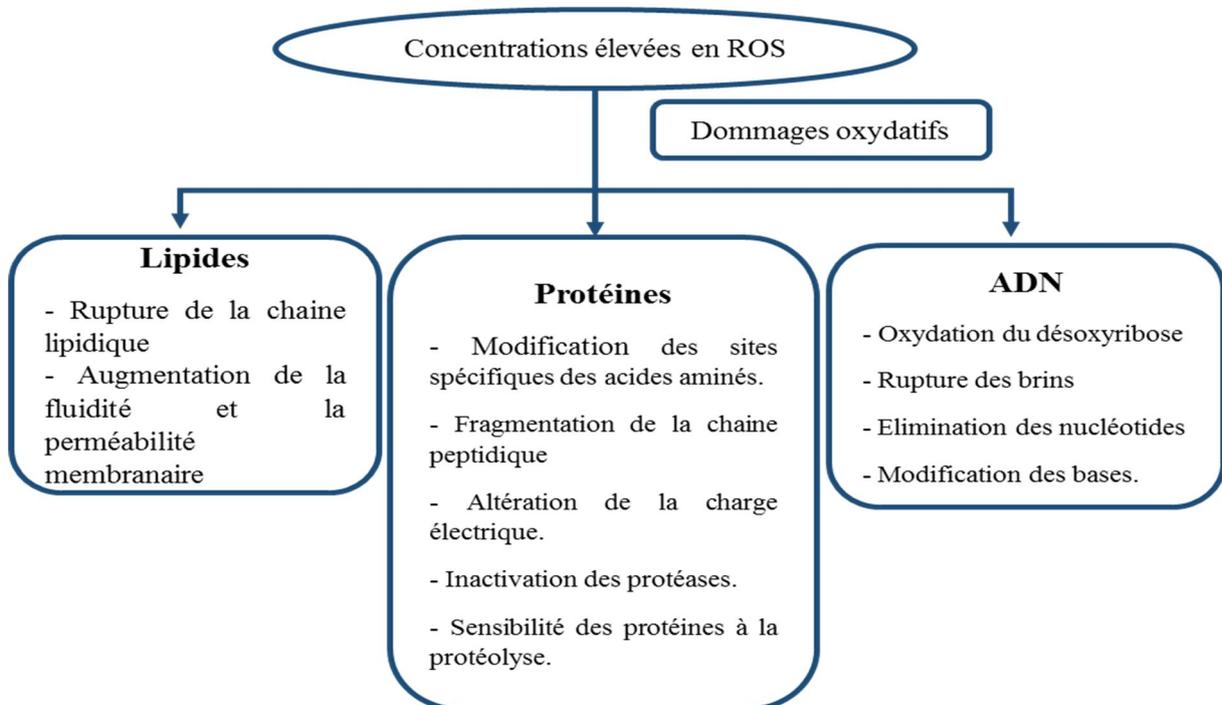


Figure 1 : Les ROS induisent des dommages oxydatifs pour les lipides, les protéines et l'ADN

2.2.1.1 Peroxydation lipidique

Lorsque le niveau des ROS atteint un certain seuil, la peroxydation lipidique augmente au niveau des deux membranes cellulaires et des organites, qui, à leur tour, affectent le fonctionnement cellulaire normal. La peroxydation lipidique aggrave le stress oxydatif par la production des radicaux de dérivés lipidiques qui peuvent agir et endommagent les protéines et l'ADN. Le niveau de la peroxydation lipidique a été largement utilisé comme un indicateur de dommages générés par les ROS aux membranes cellulaires dans des conditions stressantes.

La plus grande peroxydation des lipides a été rapportée dans les plantes qui poussent sous stress environnementaux (Sharma et al., 2005 ; Han et al., 2009 ; Tanou et al., 2009 ; Mishra et al., 2011)

L'augmentation de la LPO est corrélée avec l'augmentation de la production des ROS. Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des produits finis de la peroxydation des acides gras polyinsaturés dans les phospholipides, responsable de l'altération de la membrane cellulaire (Halliwell et al., 1999).

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) présents dans les phospholipides membranaires sont particulièrement sensibles à l'attaque par les ROS. Un seul $\cdot\text{OH}$ peut entraîner une peroxydation de nombreux acides gras polyinsaturés, car les réactions impliquées dans ce processus font partie d'une réaction en chaîne cyclique. L'ensemble du processus de la peroxydation lipidique comporte trois étapes distinctes : l'initiation, la progression et les étapes de terminaison (Smirnoff, 1995). La Peroxydation des acides gras polyinsaturés induite par les ROS peut conduire à la rupture de la chaîne et, de ce fait, augmenter la fluidité de la membrane et la perméabilité (Davies, 2000).

Tableau 2 : Les différentes phases de la peroxydation lipidique en présence des ROS et leurs réactions chimiques

Phase d'oxydation lipidique	Réaction(s) chimique(s)
Initiation	$\text{RH} + \text{OH}\cdot \longrightarrow \text{R}\cdot + \text{H}_2\text{O}$
Progression	$\text{R}\cdot + \text{O}_2 \longrightarrow \text{ROO}\cdot$
	$\text{ROO}\cdot + \text{RH} \longrightarrow \text{ROOH} + \text{R}\cdot$
Terminaison	$\text{R}\cdot + \text{R}\cdot \longrightarrow \text{RR}$
	$\text{ROO}\cdot + \text{R}\cdot \longrightarrow \text{ROR}$
	$\text{ROO}\cdot + \text{ROO}\cdot \longrightarrow \text{ROOR} + \text{O}_2$

2.2.1.2 Oxydation des protéines

Dans les conditions physiologiques, les cibles majeures des ROS sont les acides aminés soufrés (cystéine, méthionine) (Brot et Weissbach, 2000 ; Finkel, 2000), les acides aminés basiques (arginine, lysine) et les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) (Armstrong et Swallow, 1969 ; Huggins et al., 1993).

L'attaque des protéines par les ROS peut causer des modifications à ces protéines de manières directes et/ ou indirectes. La modification directe implique la modulation de l'activité d'une protéine par nitrosylation, carbonylation, formation de liaisons disulfides, et glutathionylation. Les protéines peuvent aussi être modifiées indirectement par leur conjugaison avec des produits de la dégradation de la peroxydation d'acide gras (Yamauchi et al., 2008). Par conséquent la production excessive des ROS, modifie l'acide aminé, fragmente la chaîne peptidique et provoque la protéolyse des protéines.

Certains acides aminés comme la cystéine (Cyst) sont particulièrement oxydés *via* leur groupement thiol. La cystéine une fois oxydée conduit à plusieurs composés comme l'acide cystéique, ou génère des ponts disulfures. Ceux-ci peuvent être aisément régénérés en fonction thiols, *in vivo* par le glutathion réduit ou la thiorédoxine réduite. L'oxydation réversible de la cystéine joue un rôle important dans l'activation ou l'inactivation de certaines protéines (Finkel, 2000). L'oxydation de la méthionine, particulièrement sensible au H₂O₂, s'effectue en deux étapes : l'une, réversible, conduit au sulfoxyde de méthionine ; l'autre, irréversible, donne le sulfone de méthionine, cette réaction n'étant pas possible *in vivo* (Vogt, 1995). Les acides aminés aromatiques subissent en majorité des modifications d'hydroxylation (Armstrong et Swallow, 1969 ; Huggins et al., 1993).

Les protéines oxydées servent de meilleurs substrats à la digestion protéolytique. Il a été suggéré que l'oxydation de protéines pourrait prédisposer à l'ubiquitination qui, alternativement, serait une cible pour la dégradation protéosomale (Cabiscol et al., 2000).

2.2.1.3 Dommage de l'ADN

Les ROS sont l'une des sources importantes de dommages d'ADN (Imlay et al., 1988). Ils peuvent causer des dommages oxydatifs à l'ADN nucléaire, mitochondrial et chloroplastique. L'ADN est le matériel génétique des cellules et n'importe quel dommage d'ADN peut entraîner des changements des protéines codées, ce qui peut conduire à leurs dysfonctionnements ou leurs l'inactivation complète. L'attaque oxydante sur l'ADN a comme conséquence l'oxydation du désoxyribose, une rupture des brins, une élimination des nucléotides, une variété de modifications dans les bases organiques des nucléotides, et des réticulations ADN-protéines. En outre, les changements dans les nucléotides d'un brin peuvent entraîner des mésappariements avec les nucléotides dans l'autre brin, produisant des mutations ultérieures. La dégradation de l'ADN causée par les ROS a été observée chez les

plantes exposées à divers stress environnementaux tels que la salinité (Liu et al., 2000) et la toxicité des métaux lourds (Meriga et al., 2004).

Le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) est connu pour réagir avec toutes les bases puriques et pyrimidiques et, également, avec le squelette désoxyribose (Halliwell et al., 1999). Le $^1\text{O}_2$ réagit seulement avec la guanine, tandis que l' H_2O_2 et $\text{O}_2^{\cdot-}$ ne réagissent pas avec toutes les bases (Halliwell et al., 1991).

Les dommages que font subir les ROS à l'ADN comprennent diverses modifications mutagènes. Par exemple, la mutation résultant d'une modification sélective de G : C des sites, en particulier, indique une attaque oxydante. Ils attaquent également les bases d'ADN indirectement par le biais des produits réactifs qu'ils génèrent à d'autres macromolécules telles que les lipides (Fink et al., 1997).

Dans des conditions physiologiques, ni H_2O_2 seul ni $\text{O}_2^{\cdot-}$ peuvent provoquer la rupture des brins *in vitro*. Par conséquent, il a été conclu que la toxicité associée à ces ROS *in vivo* est très probable au résultat de la réaction de Fenton. Les réticulations protéiques d'ADN ne peuvent pas être facilement réparées et peuvent être mortelles si la réplication ou la transcription précède la réparation.

L'ADN mitochondrial et des chloroplastes sont plus sensibles aux dommages oxydatifs que l'ADN nucléaire en raison de l'absence des protéines de protection (Richter, 1992). Même si le système de réparation existe pour l'ADN endommagé, des changements excessifs provoqués par les ROS entraînent des dommages permanents à l'ADN avec des effets potentiellement préjudiciables pour la cellule.

Tableau 3 : Principales espèces réactives de l’oxygène et radicaux libres impliqués dans les réactions d’oxydation de l’ADN

Espèces - Radicaux	Réactivité avec l’ADN
Peroxyde d’hydrogène (H_2O_2)	Oxydation de l’adénine
Radical hydroxyle ($\cdot OH$)	Oxydation des bases et du 2-désoxyribose
Radical superoxyde ($O_2^{\cdot -}$)	Action indirecte (réduction des radicaux $ROO\cdot$)
Radicaux alkoxydes ($RO\cdot$) et peroxydes ($ROO\cdot$)	Oxydation des bases et du 2-désoxyribose

2.2.2 Techniques de remédiation

La contamination des sols par les métaux lourds représente une grave menace pour l'écosystème et la santé humaine. Plusieurs stratégies physiques, chimiques et biologiques ont été développées pour l'élimination de ces substances toxiques, et qui peuvent être utilisées simultanément pour réduire la contamination à un niveau sûr et acceptable.

2.2.2.1 Approches physicochimiques

Les procédés chimiques consistent en solidification, précipitation et échanges ioniques. Les méthodes physiques consistent en lavage, encapsulation et l'électrokinésie du sol. La rémédiation chimique repose sur l'utilisation de produits chimiques pour décontaminer l'environnement naturel. Cependant, cette approche semble présenter quelques inconvénients car le même produit chimique ne peut pas être employé pour tous les ions métalliques (Chaney et al., 1997), et l'existence de nombreuses classes d'espèces chimiques rend très compliqué l'élimination des métaux toxiques dans l'environnement.

En résumé, les stratégies physicochimiques ont été développées pour l'élimination des métaux lourds présents dans les sols et les eaux pollués. Cependant, la plupart d'entre elles semblent être coûteuses et de faible efficacité.

2.2.2.2 Phytoremédiation

La phytoremédiation est l'utilisation de plantes pour détoxifier les polluants environnementaux (Ali et al., 2013). Cette technique est considérée comme la moins invasive, plus rentable et restaurative de la structure du sol. La phytoremédiation peut être divisée en

phytoextraction (dépollution du sol par les pousses et les feuilles), phytodégradation (dégradation des polluants par les systèmes plantes-microorganismes), rhizofiltration (absorption des polluants par les racines des plantes), phytostabilisation (réduction de la biodisponibilité des polluants par la plante), phytovolatilization (volatilisation des polluants par la plante) et phytoépuration (élimination des polluants atmosphériques par la plante) (Gadd, 2010).

La phytoextraction est l'extraction des métaux à partir du sol, qui est utilisée pour éliminer les métaux lourds, les pesticides, les xénobiotiques, et d'autres polluants toxiques. La capacité de la plante à la phytoextraction de certains métaux est le résultat de sa capacité d'absorption des métaux tels que Zn, Mn, Ni et Cu pour maintenir les fonctions naturelles (Lasat, 2002).

La chélation assistée et la phytoextraction continue consistent en l'application de divers chélateurs synthétiques qui peuvent augmenter l'accumulation de métal. Cette stratégie est élaborée lorsque les plantes n'accumulent pas naturellement les métaux toxiques à des niveaux qui seraient significatifs dans un contexte de remédiation (Gadd, 2010). La phytoextraction a attiré l'attention au cours des dernières années, pour son faible coût de mise en œuvre et ses avantages environnementaux. Cependant, les sols contaminés par des métaux lourds peuvent être un défi difficile pour la phytoextraction. Bien que certaines plantes hyperaccumulatrices semblent être capables d'accumuler des concentrations élevées de plusieurs métaux lourds simultanément (Baker et al., 2000).

La rhizofiltration est similaire à la phytoextraction, et les plantes sont essentiellement utilisées pour éliminer les polluants des eaux souterraines contaminées, mais dans ce cas les polluants sont normalement accumulés au niveau racinaire.

La phytostabilisation est l'utilisation des plantes pour immobiliser les contaminants du sol et des eaux souterraines par l'absorption et l'accumulation par les racines, soit par l'adsorption racinaire, soit par la précipitation dans la zone des racines, ce qui est utile pour le traitement de Pb, As, Cd, Cr, Cu et Zn. L'avantage de cette technologie est qu'elle est très efficace lorsque l'immobilisation est rapide et nécessaire pour préserver les eaux souterraines et de surface (Jadia, 2009).

La phytovolatilization implique la capacité des plantes à prendre des contaminants du sol, en les transformant sous formes volatiles et les libérant dans l'atmosphère (Jadia, 2009 ; Ali et al., 2013). Le métal peut être rendu inoffensif par une réduction enzymatique ou par une intégration de composés organiques moins toxiques. Les techniques de phytoremédiation, bien qu'étant lentes si on les compare aux méthodes physicochimiques, présentent l'avantage d'être moins coûteuses et beaucoup plus favorables pour l'environnement.

2.2.2.3 Bioremédiation

La bioremédiation est l'application de systèmes biologiques pour l'élimination de la pollution organique et inorganique. Les bactéries et les mycètes sont les organismes les plus importants pour la remédiation des métaux lourds.

Les microorganismes sont ubiquitaires, dominent les sols contaminés par des métaux lourds et peuvent facilement convertir ces métaux lourds en formes non-toxiques. Dans les procédés de bioremédiation, les microorganismes minéralisent les contaminants organiques en produits finis tels que le dioxyde de carbone et l'eau, ou en intermédiaires métaboliques qui seront utilisés en tant que substrats primaires pour la croissance cellulaire (Khouja, 2011).

Les microorganismes sont capables de la protection bidirectionnelle à savoir la production d'enzymes de dégradation des polluants cibles ainsi que la résistance aux métaux lourds. Différents mécanismes de bioremédiation sont connus, y compris la biosorption, les interactions métal-microorganisme, la bioaccumulation, la biominéralisation, la biotransformation et la biolixiviation.

Les différentes méthodes par lesquelles les microorganismes restaurent l'environnement sont l'oxydation, la liaison, l'immobilisation, la volatilisation et la transformation des métaux lourds (Ruchita et al., 2015).

Les mycètes sont un meilleur choix en tant que bioremédiateur en raison de leurs caractères morphologiques, physiologiques et génétiques ; ils sont ubiquitaires, capables de coloniser toutes les matrices (sol, eau, air, plantes) dans les milieux naturels dans lesquels ils jouent un rôle clé dans le maintien de l'équilibre des écosystèmes (Anastasi et al., 2013).

Les champignons sont connus pour tolérer et détoxifier les sites contaminés par les métaux en utilisant plusieurs mécanismes comme la transformation de la valence, la

précipitation intra et extracellulaire et de l'absorption active (Gadd, 1993). La composition de leurs parois leur a conféré la capacité à détoxifier les métaux, raison parmi lesquelles ils ont été considérés comme des alternatives potentielles aux résines synthétiques pour la bioremédiation des solutions métalliques et de déchets solides (Li et al., 2009).

De plus, les champignons symbiotiques peuvent être des agents éventuels pour la remédiation des sols. Les champignons mycorhiziens sont des microorganismes du sol, ubiquitaires, qui s'associent avec les racines de presque toutes les plantes terrestres et aident leurs hôtes dans l'absorption des nutriments (Smith et Read, 1997). Ils le font en explorant de vastes volumes de sol avec leur mycélium radical supplémentaire, et aussi par la solubilisation des nutriments essentiels qui se trouvent normalement sous forme de composés organiques et inorganiques insolubles (Gadd, 2010). Ils jouent un rôle clé dans de nombreux écosystèmes des sols. Ils mobilisent les nutriments provenant de sources organiques et semblent posséder des capacités saprophytiques bien développées (à savoir, l'oxydation et les enzymes hydrolytiques).

L'association mycorhizienne, est considérée comme une stratégie bénéfique dans le domaine général de la phytoremédiation, car elle augmente la tolérance des plantes aux métaux (Van der Lelie et al., 2001 ; Rosen et al., 2005 ; Gohre et Paszkowski, 2006). Les mycorhizes peuvent à la fois augmenter et/ ou réduire l'accumulation des métaux par plante, et améliorer la phytoextraction directement ou indirectement par l'augmentation de la biomasse végétale (Tullio et al., 2003).

Christie et al. (2004) ont constaté que les champignons mycorhiziens à arbuscules (AMF) ont diminué la translocation du zinc des plantes hôtes par la liaison de métaux dans les structures des mycorhizes et en immobilisant les métaux dans la mycorhizosphère. En outre, les AMF produisent la glomaline, une glycoprotéine insoluble qui peut piéger les métaux et qui pourrait être considérée comme un agent de stabilisation utile dans la remédiation des sols pollués (González-Chávez et al., 2004). Le développement des associations plantes-mycorhizes-tolérantes peuvent donc être une stratégie prometteuse pour la phytoremédiation et l'amélioration des sols.

2.3 Mécanismes de tolérance aux métaux lourds chez les champignons

Plusieurs ions métalliques, tels que Zn, Cu et Mn, sont des éléments essentiels pour les organismes vivants, mais à des concentrations élevées ils deviennent toxiques. D'autres métaux qui ne sont pas essentiels, tels que Cd, Hg et Pb sont toxiques même à de très faibles concentrations (Hall, 2002). Malgré la présence d'éléments toxiques, un certain nombre de microorganismes peuvent se développer dans les sites contaminés, ce qui pourrait être expliqué par le développement d'une grande variété de mécanismes pour faire face au stress métallique. La survie des organismes à un stress lié à la présence d'un élément toxique dépend principalement de leurs propriétés biochimiques, structurales intrinsèques, ainsi que de leur adaptabilité physiologique et/ou génétique (Gadd, 1999).

De nombreuses études *in situ* ou *in vitro* (White et al., 1997 ; Martino, 2001 ; Ansari, 2007 ; Ahmed et al., 2011) ont montré que les différents acteurs du système sol-plante (plante, champignons, et bactéries) sont présents sur des sites pollués par des métaux lourds et ils sont capables de survivre et de se développer en présence de concentrations élevées en éléments toxiques, en acquérant des systèmes de tolérance et / ou de résistance.

2.3.1 Solubilisation du métal

Généralement deux mots sont employés pour décrire la direction du transport d'un ion par une cellule : prise et flux (la prise décrit le fait que les ions toxiques envahissent la cellule tandis que le flux décrira le fait que la cellule exclue ces ions.)

La solubilisation des composés métalliques est un aspect important mais inapprécié de la physiologie fongique pour la libération des anions tels que le phosphate et les cations tels que les métaux essentiels en métal sous des formes plus disponibles pour l'absorption intracellulaire et le transport à travers les cycles biogéochimiques (Ahmed et al., 2011).

La solubilisation fongique des métaux se produit par plusieurs mécanismes comprenant :

- La protonation de l'anion du composé métallique en diminuant ainsi sa disponibilité en cations par la translocation des protons avec l'ATPase de la membrane plasmique (la production des acides organiques et /ou chélatant étant la source des protons) (Ahmed et al., 2011).

- La production de sidérophores (Khalid et al., 2012 ; Islam et Data, 2015). Les sidérophores sont des composés organiques de faible poids moléculaire, capables de complexer les éléments en solution. Ils sont produits par des bactéries ou champignons et leur permettent d'incorporer le fer dans les cellules par transport actif (Deneux-Mustin et al., 2003). Les anions d'acide organique sont fréquemment capables de former des complexes solubles avec les cations du métal, en augmentant ainsi la mobilité de ce dernier (White et al., 1997). Une telle complexation dépend des concentrations relatives des anions et des métaux en solution, du pH, et des constantes de stabilité des divers complexes (Ahmed et al., 2011).

2.3.2 Immobilisation du métal

Des éléments toxiques métalliques comprenant des radionucléides peuvent être liés, accumulés, et précipités par des mycètes jouant le rôle de récepteurs de métal par :

2.3.2.1 Biosorption du métal

Elle se fait par les parois cellulaires des mycètes, les pigments et les polysaccharides extracellulaires (Menad, 2007). Elle comporte une combinaison de mécanismes actifs et passifs de transport, commençant par la diffusion des ions métalliques sur les parois intra ou extra cellulaires de la biomasse fongique (fixation des cations due à la coordination à des groupements anioniques de la paroi) (Gadd, 1993 ; Sterflinger, 2000).

Les effets des microorganismes (bactéries, champignons) sur la biodisponibilité du cadmium sont essentiellement indirects dus aux phénomènes d'accumulation passive (biosorption) ou active (bioaccumulation), de complexation aux molécules organiques et de dissolution acide par voie microbienne (Deneux-Mustin et al., 2003). Seule la production de composés acides et/ou chélatants est susceptible d'augmenter la mobilité du cadmium.

La capacité de biosorption des cellules mortes peut être inférieure ou équivalente, voire même supérieure que des cellules vivantes. Plusieurs chercheurs ont signalé le phénomène de la biosorption des métaux par des cellules microbiennes mortes (Naeem et al., 2006 ; Chen et Wang, 2007 ; Akhtar et al., 2007 ; Bishnoi et al., 2007 ; Tsekova et al., 2007).

Wang et Chen (2006) ont trouvé que les cellules de la biomasse morte de *S. cerevisiae* diffèrent en biosorption de celle de : l'uranium (U), Zn et Cu à des pH optimums de 4 à 5.

Les cellules mortes de *S. cerevisiae* éliminent 40% plus de U et Zn comparativement aux cellules viables.

Yan et Viraraghavan (2003) rapportent que la biosorption par la biomasse morte de *Mucor rouxii* était réduite en présence de divers ions métalliques mais la capacité totale de biosorption augmente, indiquant que la biomasse de *M. rouxii* capable d'adsorber des ions polymétalliques.

Pokhrel et Viraraghavan (2006) ont rapporté une élimination potentielle de l'arsenic des solutions aqueuses par la biomasse fongique morte d'*Aspergillus niger* recouverte avec des ions de Fe, *A. niger* a montré une élimination maximale environ 95% As^{+5} et 75% As^{+3} à pH 6. Aucune interaction n'a été observée entre la charge de la surface de la biomasse et l'élimination de l'As.

L'utilisation de la biomasse morte dans les applications industrielles offre certains avantages par rapport à ceux des cellules viables. En effet les systèmes utilisant des cellules viables sont susceptibles d'être plus sensibles aux concentrations des ions métalliques (toxicité) et aux conditions d'exploitations défavorables (pH et température). En outre, un apport de nutriments constant est nécessaire pour les systèmes utilisant les cellules vivantes (avec l'augmentation des coûts d'exploitation pour la gestion des flux de déchets). De plus la récupération des métaux et la régénération de l'adsorbant sont plus compliquées par les cellules vivantes (Ahmed et al., 2011).

2.3.2.2 Bioaccumulation et séquestration intracellulaire

L'accumulation intracellulaire dépend du métabolisme cellulaire. Ceci implique que ce mode de biosorption peut avoir lieu seulement dans les cellules viables (Kamel et al., 2010).

Selon Vijver et al. (2004) les ions métalliques sont compartimentés dans différentes organelles sous cellulaires (mitochondries et vacuoles). Le mécanisme se rapporte principalement à la présence des protéines liées aux métaux, de faible poids moléculaire. Les métallothioneines sont riches en cystéine présents dans la majorité des être vivants.

Les métallothioneines et les phytochélatines peuvent être induites par beaucoup de substances, y compris les ions métalliques tels que le Cd, Cu, Hg, Co, et Zn (Vijver et al., 2004), localisés et /ou séquestrés dans les vacuoles. Les vacuoles fongiques jouent un rôle

important dans la régulation des ions métalliques dans le cytosol, et la détoxification des métaux potentiellement toxiques (Gharieb et Gadd, 1998 ; Liu et Culotta, 1999 ; Malik, 2004). Les métaux préférentiellement séquestrés par la vacuole incluent les : Mn^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , Ca^{+2} , Sr^{+2} , Ni^{+2} , les monovalents K^+ , Li^+ , et les Cs^+ (Ahmed et al., 2011).

L'accumulation des métaux par les cellules viables dépendent du temps d'incubation, du pH de la solution, des conditions de culture, de la concentration initiale métallique et de la concentration cellulaire dans le milieu (Ahmed et al., 2011).

2.3.2.3 Précipitation de composés métalliques sur et /ou autour des hyphes

Certains mycètes peuvent précipiter des métaux sous formes amorphes et cristallines, telles que les oxalates et d'autres minéraux mycogéniques secondaires (accumulation extracellulaire) (Gadd, 1999 ; Burford et al., 2003 ; 2006).

Certains microorganismes eucaryotes tels que les mycètes et les algues produisent et excrètent des substances polymères extracellulaires (EPS) telles que la glycoprotéine de polysaccharides, les lipopolysaccharides, et les lipides solubles. De nombreuses recherches sur la biosorption du métal avec les EPS ont été principalement effectuées sur des bactéries telles que : *Bacillus megaterium*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, sur les cyanobactéries, et les bactéries sulfite-réductrices, tandis que les études des EPS pour les mycètes et les algues sont limitées. (Liu et al., 2001).

Flemming et al. (2001) ont rapporté que le taux initial de prise de Pb^{+2} par les cellules vivantes de *Saccharomyces cerevisiae* est inférieur à celui des cellules mortes, alors que dans le cas d'*Aspergillus pullulans*, la capacité et le taux initial d'accumulation de Pb^{+2} des cellules viables sont plus grands que ceux des cellules mortes.

Les mycètes peuvent être des accumulateurs efficaces des formes solubles et des particules de métaux, par exemple : Ni, Zn, AG, Cu, Cd et Pb, et particulièrement des concentrations externes diluées (Gadd, 1993 ; 2000a, b ; 2001b, c ; Baldrian, 2003).

2.3.2.4 Biotransformation du métal

La transformation du métal adopte les mécanismes par lesquels l'effet des mycètes change la spéciation et la mobilité du métal. Certaines transformations métalliques par voies enzymatiques peuvent être impliquées dans la survie, étant donné que certains

métaux transformés sont moins toxiques et /ou plus volatils que les espèces d'origine (Ahmed et al., 2011). Cette biotransformation causée par des champignons inclue les réductions du Ag^+ à Ag^0 métallique, qui seront fixées sur et autour des cellules (Kierans et al., 1991) et la réduction du Cu^{+2} à Cu^+ par les composants des parois cellulaires associées à *Debaryomyces hansenii* (Breuer et Harms, 2006).

2.3.2.4.1 Oxydoréduction

Les microorganismes peuvent agir directement sur les éléments par des processus d'oxydoréduction. L'élément devient alors le donneur ou l'accepteur d'électron (Deuneux-Mustin et al., 2003). Par exemple, dans certaines conditions environnementales, le Cr peut subir une interconversion du Cr (III) en Cr (VI) par des réactions d'oxydation et / ou de réduction de nature biotique et abiotique.

2.3.2.4.2 Biométhylation

La biométhylation est un phénomène naturel que peuvent produire les microorganismes (bactéries et champignons) en fixant un groupement méthyle sur un ou deux atomes de carbone par l'intermédiaire d'agents méthylants, principalement le S-adénosyl-méthionine (Fatoki, 1997). L'arsenic, l'étain, le plomb, l'antimoine, le sélénium et l'iode peuvent être biométhylés.

Les facteurs qui influencent la biométhylation des éléments sont ceux qui influencent l'activité microbienne, comme la réserve en substrats carbonés, la température, l'humidité, le pH et la teneur en oxygène du milieu (Deuneux-Mustin et al., 2003).

La biométhylation par les champignons est le seul mécanisme, fréquemment rapporté par lequel les champignons agissent sur la disponibilité de l'antimoine dans les sols. Les exemples de la présence de composés organo-antimoniés dans des échantillons biologiques sont rares mais ils mettent en évidence, de façon indirecte, le processus de biométhylation de l'antimoine en triméthylantimoine (Deuneux-Mustin et al., 2003).

Le filamentueux *Scopulariopsis brevicaulis* est suggéré comme pouvant être agent de biométhylation d'antimoine (Andrewes et al., 2000), ainsi que *Penicillium notatum* (Bentley et al., 2002). Il n'y a toutefois aucune information quant aux quantités d'antimoine susceptibles d'être volatilisées dans un sol (Deuneux-Mustin et al., 2003).

2.3.3 Mécanismes antioxydants

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des molécules chimiquement réactives contenant de l'oxygène. Elles sont formées en tant que sous-produit naturel du métabolisme normal de l'oxygène. Cependant, les niveaux de ROS peuvent augmenter en présence de métaux redox-actifs (Fe, Mg) ou même de métaux redox-inactifs (Cd, Pb) (Schutzendübel et Poole, 2002). Chez les champignons, les ROS sont impliqués dans la différenciation cellulaire, la symbiose mycorhizienne, la virulence et la pathogénicité (Aguirre et al., 2005 ; Baptista et al., 2007 ; Egan et al., 2007 ; Molina et Kahmann, 2007). De nombreuses maladies sont associées à des dommages oxydatifs suite à un déséquilibre entre le générateur des radicaux libres et leurs systèmes de piégeage. Malgré la présence de différents sites de production à travers la cellule, les ROS sont principalement générés dans les mitochondries lors d'une réduction de la chaîne de transport d'électrons et à travers diverses oxydases (Turrens, 2003 ; Aguirre et al., 2005 ; Takemoto et al., 2007). Pour se protéger contre les dommages oxydatifs, les mécanismes de défense antioxydante sont présents pour maintenir les ROS à un bas niveau et réparer les dommages cellulaires (Fridovich, 1998).

Ces mécanismes comprennent les systèmes antioxydants non enzymatiques tels que le glutathion (GSH), les vitamines C (ascorbate), E (α -tocophérol) et B6 (Evans et Halliwell, 2001), ainsi que les systèmes antioxydants enzymatiques tels que les superoxydes dismutases, les catalases, les peroxydases et les glutarédoxines (Neil et al., 2002).

2.3.3.1 Antioxydants non-enzymatiques

2.3.3.1.1 Glutathion (GSH)

Le Glutathion (γ -L-glutamyl-L-cystéinyl-glycine : GSH) est l'un des thiols les plus abondants, de faible poids moléculaire. Il est présent dans la plupart des cellules eucaryotes et aussi dans de nombreux procaryotes (Penninckx et Elskens, 1993). Il pourrait jouer un rôle essentiel pour la protection de la cellule contre les ROS (Stephen et Jamieson, 1996). Chez les champignons, le GSH est impliqué dans le transport des acides aminés dans les cellules et les vacuoles, la protection contre le stress oxydatif, la détoxification des xénobiotiques et des métaux lourds. Il participe également à la régulation de la morphologie des cellules et du cycle de vie (Thomas et al., 1991). Les fonctions du glutathion en tant que donneur d'électrons pour la glutathion peroxydase (GPx), sont de réduire le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à l'eau (H_2O) et de contribuer à la dégradation des ROS (Meister et Anderson, 1983).

Dans le mécanisme de tolérance aux métaux, le GSH peut fonctionner par différents moyens tels que la chélation et la séquestration du métal, la protection contre l'oxydation métallique induite, et la liaison à des groupes réactifs de sulfhydryle de protéines (glutathionylation).

La synthèse du GSH se fait en deux étapes successives catalysées par des enzymes distinctes. Le GSH peut réduire un certain nombre d'oxydants par l'enzyme GPx, ou par voie non enzymatique, donnant naissance à sa forme oxydée, glutathiol ou glutathion oxydé (GSSG), en reliant les deux résidus cystéine. Le GSSG est réutilisé et réduit en GSH par une réaction dépendante de la NADPH catalysée par la glutathion réductase (GR) (Li et al., 2009).

Chez le champignon filamenteux *Penicillium chrysogenum*, les activités du glutathion (GPx, et GR) augmentent en réponse au stress oxydatif (Emri et al., 1997 ; 1999). De même, chez *Aspergillus niger*, l'ajout d'H₂O₂ conduit à une augmentation du contenu intracellulaire du GSH (Li et al., 2008).

2.3.3.1.2 Vitamines

Les vitamines, C (ascorbate), E et B6, sont également considérées comme des antioxydants efficaces dans les cellules. L'acide L-ascorbique, qui est un piègeur de radicaux libres efficace avec des fonctions métaboliques importantes, est produit par les plantes et certains mammifères (Khouja, 2011). Cependant, il semble que les champignons ne synthétisent pas normalement l'ascorbate mais des espèces fongiques étudiées contiennent le D-Erythroascorbate (D-EAA), une analogue de l'ascorbate C5.

La présence de D-EAA à la place de L-ascorbate a été observée chez les ascomycètes, les basidiomycètes et les zygomycètes (Baroja-Mazo et al., 2005). Chez le zygomycète *Phycomyces blakesleeanus*, les deux composés D-Erythroascorbate (DEAA) et D-glucoside erythroascorbate (D-EAAG) peuvent agir comme des antioxydants (Baroja-Mazo et al., 2005). La vitamine E est considérée comme l'un des principaux composants pour la protection contre la peroxydation lipidique et des ROS (Akiyama, 1999). La vitamine E agit comme un piègeur de radicaux libres tels le peroxyde lipidique, l'alcoxy et des radicaux hydroxyles.

2.3.3.1.3 Proline

La proline est un acide aminé protéinogénique qui favorise une série de fonctions cellulaires. Elle peut fonctionner comme osmolyte piègeur de radicaux, régulateur du potentiel redox cellulaire, chélateur de métaux, inhibiteur de la LPO, stabilisateur des macromolécules et composant de la paroi cellulaire (Matysik et al., 2002). Sa concentration intracellulaire dépend de sa régulation entre sa biosynthèse et sa dégradation (Gill et Tuteja, 2010).

Outre son rôle dans le métabolisme primaire en tant que constituant des protéines, la proline est l'une des molécules souvent accumulées en réponse au phénomène couramment observé lors d'un stress environnemental chez les bactéries, les champignons, les protozoaires, les algues, les plantes et les invertébrés marins (Csonka, 1981 ; Matysik et al., 2002 ; Verbruggen et al., 2008 ; Szabados et al., 2010).

Dans les populations métallotolérantes, la proline s'avère être constitutivement en fortes teneurs. Ce qui conduit à en conclure sa grande tolérance aux métaux (Siripornadulsil et al., 2002 ; Sharma et al., 2006). Elle est aussi considérée comme un antioxydant non enzymatique dont les organismes ont besoin pour agir contre les ROS (OH^\bullet et $^1\text{O}_2$) formés lors d'un stress salin, métallique, ou au rayonnement UV (Yang et al., 2009 ; Benhamdi, 2014).

Les études de Chakraborty et al. (2014) ont montré une augmentation graduelle et significative de la production de proline intracellulaire par *Aspergillus foetidus* lors d'un traitement avec le Cd, ce qui indique son rôle pour stabiliser et piéger les ROS générés par une forte concentration en Cd.

Mukherjee et al. (2010) ont étudié la tolérance d'*Aspergillus niger* au stress généré par la toxicité de l'arsenic : la teneur en proline intracellulaire a augmenté d'une façon linéaire jusqu'à 75 mg/L de traitement par l'arsénite. Au-delà de cette concentration la proline diminuait. La proline est connue pour détoxifier les ROS générés par un stress (Smirnov, 1993), mais il s'avère que le mécanisme devient désorganisé au-delà d'un certain seuil.

2.3.3.2 Antioxydants enzymatiques

Pour se protéger des effets délétères des ROS, les organismes vivants ont développé certains moyens de défense contre les atteintes des radicaux libres. Des activités enzymatiques

clés occupent une place centrale dans les mécanismes de détoxification des ROS : il s'agit des superoxydes dismutases (SOD), des catalases (CAT), des peroxydases (POD), des enzymes du cycle de l'ascorbate (APX, DHAR, et MR) et des enzymes du cycle d'oxydoreduction du glutathion (principalement GR et GPX). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire.

2.3.3.2.1 Superoxyde dismutase (SOD)

Les superoxydes dismutases (EC 1.15.1.1) sont des métallo-enzymes se retrouvant dans l'ensemble du monde vivant, mis à part dans quelques microorganismes (Alscher et al., 2002). La Superoxyde dismutase (SOD) joue un rôle majeur dans la défense antioxydante en catalysant la dismutation de radicaux $O_2^{\cdot-}$ à H_2O_2 et O_2 . Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est ensuite éliminé par les catalases, glutathion peroxydase (GPx) et /ou peroxyrédoxines (Prx).

Sur la base du métal au niveau du site actif, les SODs sont classés en SOD de fer (Fe-SOD), SOD de manganèse (Mn-SOD), SOD de cuivre-zinc (Cu / Zn-SOD), et SOD de nickel (Ni-SOD) (Miller, 2004). *Saccharomyces cerevisiae* possède deux SOD : la Cu / Zn-SOD (produit du gène *sod1*) et la Mn-SOD (produit du gène *sod2*) (Garay-Arroyo et al., 2003). La Cu / Zn-SOD a été initialement localisée dans le cytosol, mais elle a également été trouvée dans l'espace intermembranaire des mitochondries (Sturtz et al., 2001 ; Nedeva et al., 2004), tandis que, la Mn-SOD se trouve dans la matrice mitochondriale.

Généralement, la Cu / Zn-SOD a un rôle majeur dans la première ligne de défense contre les ROS, tandis que la Mn-SOD est seulement impliquée dans les mécanismes de protection dans les mitochondries (Li et al., 2009). Les deux SOD mentionnées précédemment ont également été étudiée chez d'autres champignons. *Penicillium chrysogenum* en présence de ménadione dans le milieu, induit une augmentation à la fois de la Cu / Zn-SOD et des activités de Mn-SOD (Pócsi et al., 2005).

De même *Aspergillus niger*, en réponse au stress oxydatif provoqué par l'addition de H_2O_2 exogène, de ménadione (Kreiner et al., 2002) et de cadmium (Todorova et al., 2008), est corrélée avec l'augmentation de l'activité de la SOD. Guelfi et al. (2003) ont rapporté une augmentation de l'activité de la SOD chez *A. nidulans*, en réponse au stress généré par le Cd. Pour chercher des gènes qui pourraient être impliqués dans la tolérance aux métaux chez le champignon mycorhizien *P. involutus*, Jacob et al. (2001) ont isolé un ADNc complémentaire

codant pour une enzyme SOD, qui a été cloné chez *E. coli* qui ne présente aucune tolérance pour le paraquat et / ou le cadmium ; ils ont observé que le clone *Pisod* codant pour la superoxyde dismutase est fonctionnelle contre le stress oxydatif généré par le paraquat et le cadmium.

2.3.3.2.2 Catalase (CAT)

La CAT (EC 1.11.1.6) est une enzyme tétramère, principalement peroxysomale, qui catalyse le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en H_2O et O_2 , en réduisant ainsi les niveaux de peroxyde d'hydrogène intracellulaires (Chelikani et al., 2004).

La levure *S. cerevisiae* possède deux catalases (Skoneczny et Rytka, 2000), une catalase peroxysomale (catalase A : *CTAI*) et une catalase cytosolique (catalase T : *CTTI*). Le double mutant *CTAI* / *CTTI* est hypersensible au peroxyde, ce qui suggère que les deux catalases jouent un rôle important dans la tolérance au stress oxydatif (Martins et English, 2014).

Chez les champignons filamenteux, plus d'un gène de la catalase existe et qui sont régulés différemment. Chez *A. nidulans*, deux catalases ont été identifiées, la *CATA* et *CATB* (Kawasaki et Aguirre, 2001). Les deux gènes peuvent être induits par une variété de stress : la *CATA* est augmentée en présence du stress oxydant, du stress osmotique, et des carences d'azote / carbone, tandis que la *CATB* est induite principalement par le H_2O_2 , le paraquat et le stress thermique.

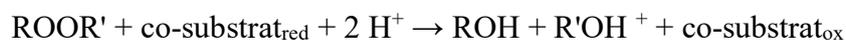
En outre, une forte concentration de $CdCl_2$ induit une légère augmentation de l'activité de CAT totale chez *A. nidulans* (Guelfi et al., 2003). Les homologues de *CATA* et *CATB* ont été identifiés dans d'autres espèces d'*Aspergillus*, tels que *A. oryzae* (Hisada et al., 2005) et *A. fumigatus* (Takasuka et al., 1999). Chez *Neurospora crassa*, deux catalases ont été identifiées *CAT1* et *CAT3* (Schliebs et al., 2006). Les catalases peuvent être induites par H_2O_2 , le paraquat et le cadmium. Dans le champignon pathogène *Cryptococcus neoformans*, quatre catalases ont été identifiées (*CAT1*, *CAT2*, *CAT3* et *CAT4*).

Il a été démontré que ces catalases sont impliquées dans le système de défense antioxydant. Giles et al. (2006) ont émis l'hypothèse que les catalases peuvent contribuer à la résistance contre le stress oxydatif suivant l'un des deux modèles : (i) les activités des catalases individuels pourraient contribuer à la résistance contre le stress oxydatif

indépendamment ; ou bien ; (ii) l'ensemble des gènes de la famille de la catalase pourraient fonctionner en collaboration.

2.3.3.2.3 Peroxydases (POX)

Les POX (EC 1.11.1.x) forment une large famille multigénique d'enzymes hémiques catalysant la réduction d'un substrat oxydé en utilisant de nombreux co-substrats comme donneurs d'électrons. Pour la majorité de ces enzymes, le substrat optimal est le peroxyde d'hydrogène, mais elles peuvent facilement réduire des hydroperoxydes organiques ou des peroxydes lipidiques (Delannoy et al., 2006).



Dans certaines conditions, une partie des POX (classe I et III) peut avoir une activité similaire à la catalase (*catalase-like*), c'est-à-dire qu'elles possèdent la capacité de réduire l' H_2O_2 en absence de co-substrat (Mika et al., 2004).

La peroxydase (POD) (EC 1.11.1.7) appartient à une grande famille d'enzymes ubiquitaires, chez les champignons, les plantes et les vertébrés. Ces protéines contiennent habituellement de la ferriprotoporphyrine IX en tant que groupement prosthétique, et oxydent plusieurs substrats en présence de peroxyde d'hydrogène (Penel et al., 1991 ; Vianello et al., 1997).

Selon leur classification, la famille des peroxydases inclut les enzymes procaryotiques (catalase-peroxydase, cytochrome *c* peroxydase, ascorbate peroxydase APX), les enzymes fongiques (la lignine et le manganèse peroxydase) ainsi que les enzymes végétales. Les peroxydases diffèrent sensiblement l'une de l'autre dans leurs structures primaires, bien que les motifs de structure cristalline et des centres catalytiques soient très similaires (Finzel et al., 1984 ; Sculler et al., 1996).

Les peroxydases fongiques sont classées en deux groupes : les glutathion peroxydases (GPx), qui utilisent le GSH et les peroxyrédoxines (PRXS), qui utilisent la thiorédoxine (TRX) comme réductant.

2.3.3.2.4 Glutathion peroxydases (GPx)

La glutathion peroxydase (GPx) est un type de peroxydase, dont le donneur d'électrons est le GSH. Contrairement aux catalases, la GPx pourrait aussi réduire les peroxydes organiques, en plus de H₂O₂. Chez *S. cerevisiae*, trois GPx ont été identifiés et nommés GPx1, GPx2 et GPx3 (Inoue et al., 1999). Dans ce même travail, ils ont constaté que l'expression du gène a été induite par le même stress oxydatif que dans GPx2.

Chez les champignons, plusieurs auteurs ont rapporté des activités GPx-like. Comme chez *P. chrysogenum*, l'activité de la GPx est induite par le superoxyde et l'H₂O₂, (Pócsi et al., 2005), tandis que chez *A. niger* la GPx semble jouer un rôle mineur dans la décomposition de H₂O₂ (Bai et al., 2003).

2.3.3.2.5 Peroxyredoxines (PRXs)

Les peroxyrédoxines (PRXs) forment une famille de peroxydases thiol-spécifiques, et ils sont présents dans tous les règnes du vivant. Les activités de la peroxydase et de la peroxy-nitrite réductase PRXs dépendent de la transition de thiol-disulfite des cysteines soutenus par des donneurs d'électrons tels que la thiorédoxine (TRX) et le cyclophiline. Les PRXs sont divisées en trois classes : 2-Cys PRXs typique ; 2-Cys PRXs atypiques ; et 1-Cys PRXs (Wood et al., 2003).

2.3.3.2.6 Ascorbate peroxydase

L'ascorbate peroxydase (APX) (EC 1.11.1.11), est une hémoperoxydase de classe I à structure dimérique, une métallo-enzyme contenant un groupe ferriprotoporphyrine IX, caractérisé par une grande affinité pour son substrat, l'ascorbate. Elle est retrouvée dans différents organites de la cellule (Matamoros et al., 2003). L'APX utilise l'ascorbate comme co-substrat pour réduire le peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



Le monodéhydroascorbate (MDHA) formé par cette réaction est spontanément transformé en déhydroascorbate (DAsA), ou bien il est réduit en ascorbate sous l'action de la MDAsA réductase en présence de NAD(P)H. Le DAsA est réduit en AsA par la DAsA reductase en présence de glutathion (GSH). Le glutathion est ensuite régénéré par la GSH

réductase en présence de NAD(P)H. Cette cascade de réactions forme le cycle ascorbate-glutathion (Asada, 1992 ; Shigeoka et al., 2002).

Matériel et méthodes

1. Objectif

La présente étude est structurée en trois chapitres :

Le premier chapitre, l'analyse microbiologique, a pour objectif d'investiguer et d'identifier la mycoflore endophytique des systèmes racinaires d'*Hedysarum pallidum* Desf et de *Lygeum spartum* L, et de sélectionner et d'identifier, *via*, l'approche moléculaire le ou les mycoendophytes résistants à des teneurs élevées en antimoine et en arsenic.

Le deuxième chapitre, l'analyse toxicologique, consiste à quantifier les teneurs des métalloïdes dans la biomasse des mycoendophytes résistants, afin de déterminer les mécanismes cellulaires de résistance de ces souches vis-à-vis de la toxicité du milieu. Cette analyse a été effectuée au Laboratoire de Biochimie & Physiologie Moléculaire des Plantes (INRA Montpellier).

Le dernier chapitre, l'analyse biochimique, est consacré à l'évaluation du potentiel antioxydant en réponse au stress généré par la toxicité graduelle de Sb et As, par la mesure des biomarqueurs enzymatiques et non enzymatiques des mycoendophytes résistants.

Toutes les analyses microbiologiques et biochimiques ont été effectuées au Laboratoire de Biologie et Environnement (LBE) au Bio-Pôle Chaabet Erssas de l'université des frères Mentouri – Constantine 1.

2. Zone d'étude

Le présent travail porte essentiellement sur la région d'Ain Babouche et plus précisément sur Djebel Hamimat où se trouve une ancienne mine d'antimoine abandonnée à ciel ouvert. Cette région est semi-aride, dans le Nord Est Algérien, située à 90 km de Constantine, plus précisément dans la wilaya d'Oum El Bouaghi (Figure 2), et possédant les données géographiques suivantes : de 35° 58 ' 37, 64 " Nord 7° 11 ' 22, 80 " Est à 36° 01 ' 09, 78 " Nord 7° 14 ' 38, 38 " Est.

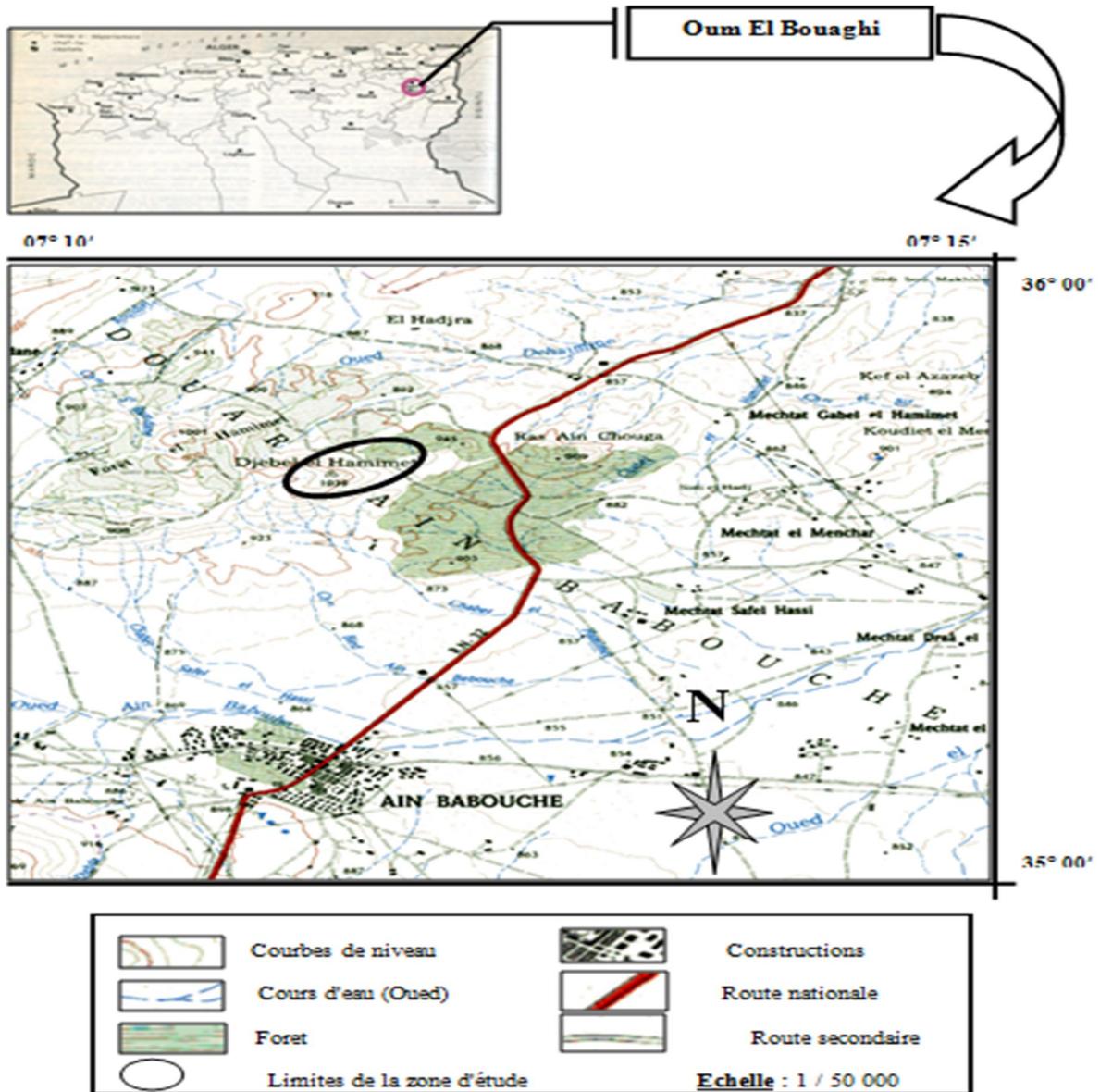


Figure 2 : Localisation géographique de la zone d'étude Ain Babouche
(Kassa-Laouar et al., 2020)

Les principaux paramètres physico-chimiques du sol présentent les valeurs suivantes : $0,9 \pm 0,04$ (%) de matière organique (MO), un pH de $8,01 \pm 0,09$; $38,7 \pm 1,82$ (%) de CaCO_3 ; $23,0 \pm 4,9$ (%) d'argile ; $16,3 \pm 1,02$ (%) de limon ; $53,7 \pm 3,22$ (%) de sable ; $\text{Sb } 62000 \pm 4924$ mg kg^{-1} ; $\text{As } 2300 \pm 186$ mg kg^{-1} (Benhamdi et al., 2014). Le sol étudié a en grande partie une texture sableuse, un pH modérément alcalin, des teneurs faibles à moyennes en matière organique, et des teneurs élevées en CaCO_3 .

Du fait de la toxicité du milieu, très peu de plantes parviennent à s'établir sur les déblais de mines. Or, les travaux de Rached-Mosbah et al. (1997) ; Benhamdi et al. (2014) ; Bentellis et al. (2014) ont mis en évidence l'existence d'espèces végétales (dont *Hedysarum pallidum*

Desf et *Lygeum spartum* L) capables de se développer sur de tels substrats toxiques et de prélever des quantités élevées de métalloïdes.

Selon Rached-Mosbah et al. (1992) et Benhamdi et al. (2014), ces deux espèces végétales sont considérées comme étant des espèces indifférentes c'est-à-dire présentes aussi bien sur les sols à faibles concentrations que sur les sols à fortes concentrations en métalloïdes. Les mêmes auteurs ont montré que *Hedysarum pallidum* Desf. et *Lygeum spartum* L. ont la capacité de tolérer de fortes concentrations en métalloïdes dans le sol, soit par leur accumulation dans les tissus comme c'est le cas pour *H. pallidum*, soit par la tendance à les exclure de leurs tissus comme c'est le cas pour *L. spartum* (Tableau 4).

Tableau 4 : Teneurs en Sb et As dans le sol et les espèces végétales étudiées

Les valeurs sont représentées en fonction de la MOY ± SEM de six répétitions. Pour chaque variable, les différentes lettres (a, b) indiquent les différences statistiques entre les zones correspondantes (en utilisant ANOVA suivie par le test de Tuckey, $p < 0,05$) (Benhamdi et al., 2014).

	Sb (mg/kg)			As (mg/kg)		
Sol	62000±4924a [41590-81446]			2300±186a [1556-3080]		
Plantes	Racines	Parties aériennes	Facteur de Translocation	Racines	Parties aériennes	Facteur de Translocation
<i>H. pallidum</i>	90,02 ± 11,48 [20,86-182,94]	72,20 ± 16,80 [4,05-263,04]	1,21 ± 0,31a [0,053-4,94]	27,00 ± 7,37 [1,95-116,74]	10,75 ± 2,67b [1,02-46,28]	0,86 ± 0,24a [0,195-4,42]
<i>L. spartum</i>	61,04 ± 8,10 [11,06-126,18]	18,58 ± 3,53b [1,79-54,49]	0,34 ± 0,055 [0,077-0,94]	71,66 ± 29,36 [4-611,01]	5,58 ± 2,39b [0,11-49,78]	0,15 ± 0,04 [0,002-0,84]

3. Echantillonnage des plantes étudiées

Tous les prélèvements sont effectués en mois de Février (21/02/2013) de manière aseptique selon les étapes suivantes :

A l'aide d'une tarière stérile (flambée avec de l'éthanol sur place), on creuse à différents endroits d'une zone étudiée considérée hautement polluée avec des teneurs allant jusqu'à 62000 mg kg⁻¹ en Sb, et 2300 mg kg⁻¹ en As, des trous d'une profondeur de 10 cm environ.

A l'aide d'une spatule stérile, les échantillons (8 spécimens de chaque plante) sont prélevés au niveau des racines profondes des plantes, puis transvasés dans des bocaux stérilisés et étiquetés. Les 16 échantillons ont été conservés dans un congélateur à une température égale à - 20° C jusqu'à leur utilisation.

4. Description du matériel biologique

4.1 *Hedysarum pallidum* Desf.

Selon Quezel et Santa (1962), *Hedysarum pallidum* Desf est une plante vivace diploïde, cespiteuse, à longues tiges plus ou moins prostrées, appartenant au genre *Hedysarum* (*Sulla* ou Sainfoin d'Espagne) et à la famille des *Fabacées* (légumineuses), qui compte environ 10000 à 30000 espèces (Ozenda, 1958), et à la sous-famille des Papilionacées, tribu des Hedysarées (Mosbah-Bentellis, 2014). Elle présente des inflorescences en grappes plus ou moins allongées, atteignant 10 à 15 cm à la fructification, de grandes fleurs rosées ou blanches lavées de pourpre, parfois blanches, et des calices entièrement hispides (Mosbah-Bentellis, 2014). On la rencontre dans l'Oranie, le Constantinois et les Aurès (Quezel et al., 1962 ; Goudjil-Benhizia, 2014). Selon ces mêmes auteurs, on la trouve également dans les forêts et les broussailles.

Le genre *Hedysarum* se subdivise en deux groupes d'espèces se distinguant par la morphologie, le cycle biologique, le caryotype et les origines géographiques. Le premier groupe comprend les espèces alpines, arctiques, et asiatiques et le second, les espèces méditerranéennes (Baatout et al., 1991 ; Mosbah-Bentellis, 2014 ; Goudjil-Benhizia, 2014). De plus, selon Benhamdi et al. (2014) cette plante accumule jusqu'à 90 mg kg⁻¹ de Sb et 27 mg kg⁻¹ d'As dans ses parties racinaires.

Classification selon Cronquist (1981) :

(<http://www.gbif.org/species/2961060/classification>)

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Genre : *Hedysarum*

Espèce : *Hedysarum pallidum*



Figure 3 : Photographie des touffes d' *H. pallidum* Desf.

4.2 *Lygeum spartum* L.

Le *Lygeum spartum* L. est une plante vivace, caractérisée par un ensemble de talles semblables qui lui donnent un aspect touffu, souvent confondue avec l'Alfa à l'état végétatif (Quezel et Santa, 1962). C'est l'une des espèces caractéristiques de la steppe Algérienne, appelée communément « *Sparte* » en français. En arabe, elle est nommée « *Sennagh* » ou « *Sengha* » ou encore « *Sennak* » (Killian, 1948 ; Ozenda, 1958 ; Mosbah-Bentellis, 2014).

Cette plante endémique du Nord de l'Afrique (Algérie, Maroc et Tunisie) est considérée comme une plante circumméditerranéenne. Elle croît spontanément dans le sud de l'Espagne, en Andalousie (Mosbah-Bentellis, 2014), et se trouve également dans le sud de l'Italie. En Algérie, les peuplements du *sparte* sont localisés dans le Sud constantinois, le Sud algérois (Sauf la Kabylie), le Sud oranais et les hauts plateaux jusqu'au Sahara, où il pénètre à peine (Ozenda, 1958 ; Quezel et Santa, 1962), avec une meilleure répartition dans le Sud-Ouest oranais (Mosbah-Bentellis, 2014). Dans les conditions naturelles, cette plante se régénère essentiellement par voie végétative, grâce à son rhizome, comme la plupart des Poacées vivaces (Djabeur et al., 2008). Dans les travaux de Benhamdi et al. (2014), cette plante accumule jusqu'à 72 mg kg⁻¹ d'As et 61 mg kg⁻¹ d'As dans ces racines.

Classification selon Cronquist (1981) :

(<http://eol.org/pages/1115570/overview>)

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Liliopsida

Ordre : Poales

Famille : Poaceae

Genre : *Lygeum*

Espèce : *Lygeum spartum*



Figure 4 : Photographie des touffes de *L. spartum* L.

5. Analyses microbiologiques

5.1 Isolement et purification des mycoendophytes

Les racines des différents échantillons sont lavées à l'eau stérile pour éliminer les particules du sol puis sont immergées successivement dans une solution d'éthanol à 75% (v/v) pendant 2 minutes et de l'eau de Javel (35° de Chlore) à 5% pendant 1 minute. Ensuite elles sont rincées 3 fois à l'eau distillée stérile pour éliminer les agents de stérilisation. Après le dernier rinçage, 0,3 ml de l'eau de rinçage finale estensemencée sur PDA supplémentée en gentamicine, et incubée à 28°C jusqu'à l'obtention d'une éventuelle croissance. Les racines lavées sont coupées en petits morceaux,ensemencées sur milieu PDA, et incubées à 28° C pendant 1 à 2 semaines. Après incubation, les souches endophytes obtenues sont repiquées et purifiées sur milieu PDA (Deng et al., 2011). Les mycoendophytes purifiés, ont été conservées à -20° C en présence d'un cryoprotecteur (glycérol 20% (v/v)).

5.2 Fréquence de colonisation (FC)

La fréquence de colonisation ou d'infection est exprimée en % contrairement à la fréquence d'isolement d'un individu. Elles sont calculées en se basant sur les formules de Fisher et Petrini (1987) et Tejesvi et al. (2006), données comme suit :

$$\text{FC \%} = (\text{Nc} / \text{Nt}) \times 100$$

$$\text{FI} = (\text{Ni} / \text{Nt})$$

Où : FC = Fréquence de colonisation ou d'infection. Nc = Le nombre de segments colonisés par une espèce ou un groupe fongique. Nt = Le nombre total des segments. FI = Fréquence d'isolement d'un individu. NI = Le nombre d'isolement d'un mycotaxon.

6. Screening des mycoendophytes résistants à l'antimoine et l'arsenic

La sélection des souches fongiques endophytes résistantes aux métalloïdes, à savoir l'antimoine et l'arsenic, se fait selon la méthode de Shin et al. (2012).

La résistance aux métalloïdes est déterminée par l'ensemencement d'un disque mycélien (de 0,5 cm de diamètre) sur des plats d'agar et sur bouillon Sabouraud modifié. Une culture jeune des mycoendophytes estensemencée aseptiquement sur milieu de culture (gélose et bouillon) supplémenté avec des concentrations croissantes d'antimoine et d'arsenic (2,5 mM

jusqu'à 550 mM Sb et de 2,5 mM jusqu'à 40 mM As). Les cultures sont incubées à 28° C pendant 96 h. La croissance fongique est suivie quotidiennement en se référant au témoin (culture sur Sabouraud sans ajout du métal).

La plus faible concentration d'un métal, qui inhibe la croissance visible des isolats est considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI) (Khan et al., 2018).

Les ions métalliques ont été ajoutés au milieu de culture à partir des solutions mères métalliques autoclavées pendant 45 min. Les sels de métaux utilisés pour cette étude sont : l'antimonite Sb (III) sous forme de tartrate antimonyl de potassium trihydrate ($C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$ Sigma-Aldrich), et l'arsenite As (III) sous forme de sodium métaarsenite ($NaAsO_2$ Sigma-Aldrich) (Neijssel et al., 1990).

6.1 Identification des mycoendophytes

L'identification des endophytes fongiques fait appel aux caractères cultureux (identification macroscopique) et aux caractères morphologiques (identification microscopique).

6.1.1 Les caractères cultureux

Les caractères cultureux sont déterminés après ensemencement des souches pures sur le milieu de culture d'isolement (PDA). L'évaluation de l'ampleur de la croissance est observée après 7 jours d'incubation à 28° C.

La texture, la couleur de la face et du revers, le diamètre de la colonie, la présence ou l'absence des pigments diffusibles et la topographie sont les révélateurs clés des critères cultureux.

6.1.2 Les caractères morphologiques

L'observation de la morphologie du mycélium et des spores consiste à faire un montage du matériel fongique à l'état frais entre lame et lamelle en présence du bleu de lactophénol, soit en réalisant des cultures sur lames. Cette dernière est appliquée essentiellement aux souches dont la structure est fragile ou dans le cas où le prélèvement du mycélium est difficile (cas des structures transparentes). Cette technique consiste à découper un carré de gélose de 1 cm, puis à le déposer au centre d'une lame stérile dans une boîte de Pétri (Koenig, 1995).

Une petite bouture du mycélium à étudier est ensemencée au centre de chacun des côtés du carré et recouverte avec une lamelle stérile après avoir versé des gouttelettes d'eau distillée stérile au fond de la boîte de Pétri afin d'éviter le dessèchement de la gélose.

L'incubation se fait à 28° C. Lorsque le développement est jugé suffisant, la lamelle est retirée délicatement et déposée sur une lame contenant du bleu de lactophénol.

L'observation microscopique se fait à l'objectif x10 et x40, et selon les clés de détermination décrites par Botton et al. (1990).

6.1.3 Identification moléculaire des mycoendophytes

L'identification moléculaire a été réalisée au Laboratoire de Biochimie & Physiologie Moléculaire des Plantes (INRA Montpellier-France).

6.1.3.1 Isolement de l'ADN génomique

Les souches sélectionnées, sont ensemencées sur bouillon Sabouraud à 30° C sous agitation 175 rpm, pendant 96 h. La biomasse obtenue est filtrée par le papier Watman N°1 (stérile) puis rincée avec de l'eau ultra-pure stérile, puis conservée à -80° C jusqu'à l'utilisation.

L'extraction de l'ADN génomique total est faite en utilisant le kit Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega) (Annexe 2). L'ADN extrait est dosé au NanoDrop Spectrophotometer. L'absorbance est lue à 260 nm en utilisant 1 µL d'ADN. La concentration est affichée directement sur l'appareil en ng/µL.

6.1.3.2 Choix des amorces par la PCR

Pour l'amplification de l'ADN des régions ITS 1, ITS 2 en incluant le gène 5,8S RNAr, plusieurs couples d'amorces ITSs ont été utilisés. Pour la discrimination entre les espèces d'*Aspergillus*, une amplification du gène Calmodulin (*Protein-coding marker CaM*) a été réalisée. Pour le genre *Fusarium*, une amplification de la région correspondante aux gènes des facteurs d'élongation et de la traduction 1-alpha (*tef 1*) (*EF-1α*) a été réalisée.

Tableau 5 : Les différents couples d'amorces choisis pour l'amplification de l'ADN

Nom d'amorce		Séquence
ITS 1	F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS 2	R	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS 3	F	GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS 4	R	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS 1F	F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS 86F	F	GTGAATCATCGAATCTTTGAA
ITS 86R	R	TTCAAAGATTCGATGATTCAC
EF 1	F	ATGGGTAAGGAAGACAAGAC
EF 2	R	GGAAGTACCAGTGATCATGTT
NIG 1	F	GATTTTCGACAGCATTTCAGAA
NIG 2	R	AAAGTCAATCACAATCCAGCCC
TUB 1	F	TCGACAGCTATTTCCCCCTT
TUB 2	R	TAGCATGTCATATCACGGGCAT

Les réactions PCR sont réalisées pour chaque couple d'amorces et pour les différentes combinaisons. Dans un volume réactionnel final 25 µL, sont ajoutés : 1 µL d'ADN génomique, 24 µL du Mix contenant (15,8 µL eau Milli-Q, 5 unités du tampon approprié à l'enzyme (Green GoTaq® Reaction Buffer, Promega), 10 µM de dNTPs, 10 µM d'amorces et 5 unités de GoTaq G2 DNA Polymerase). 10 tubes sont préparés pour chaque couple d'amorces :

- 2 tubes témoins où l'eau est utilisée à la place de l'ADN génomique,
- 4 tubes pour l'ADN d'*Aspergillus*,
- 4 tubes pour l'ADN de *Fusarium*.

L'amplification est réalisée par le thermocycleur « Master Cycler gradient » en appliquant le programme de 2 min à 94° C pour la dénaturation, suivie d'une série de 40 cycles avec trois phases :

- dénaturation de 1 min à 94° C,
- hybridation des amorces avec la séquence adéquate de 30 s à la température spécifique d'hybridation des amorces à 60° C.
- élongation à 72° C de 1 min.

À la fin des 40 cycles, les échantillons sont placés à 4° C pour stopper la réaction.

6.1.3.3 Vérification des amplifiats par électrophorèse

L'électrophorèse des fragments d'ADN amplifiés est réalisée sur un gel d'agarose (à 1,2% w/v) dans lequel est ajouté un agent intercalant fluorescent sous rayonnements ultraviolets (10 µL pour 50 mL du gel). La migration a lieu en présence du tampon TAE 0,5X à un voltage constant (de 50 à 100 V) pour une durée de 15 à 20 minutes. Le marqueur de taille utilisé est le Benchtop 1kb DNA Ladder (Promega).

6.1.3.4 Séquençage

Les amplifiats ont été séquencés au Laboratoire Eurofins/ Genomics (Germany).

6.1.3.5 Comparaison des séquences avec la banque informatique

Les séquences obtenues ont été soumises à une recherche d'homologie de séquences en utilisant le programme BLAST (Blast Local Alignment Search Tool) sur le site NCBI (National Center For Biotechnology Information) pour rechercher les séquences les plus proches déposées dans *GenBank* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul et al., 1997).

6.1.3.6 Analyse phylogénétique et reconstruction d'arbre phylogénétique

L'analyse phylogénétique consiste à évaluer les divergences entre plusieurs séquences : plus le nombre de substitutions entre deux séquences est élevé, plus la probabilité que ces deux séquences aient un ancêtre commun est faible. L'arbre phylogénétique est une représentation des résultats obtenus.

L'arbre phylogénétique a été construit à l'aide du logiciel MEGA (7.0.14) (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar et al., 2016), après alignement avec MUSCLE des séquences (Edgar, 2004). Ce logiciel se base sur des méthodes mathématiques et génère des arbres phylogénétiques représentant les relations entre organismes. Cet arbre est construit à l'aide de Neighbor-joining (Saito et Nei, 1987), en utilisant les paramètres de substitution du modèle p-distance (Nei et Kumar, 2000). Le Bootstrap est calculé à partir de 1000 répliquats.

7. Tests *in vitro* de toxicité

La bioaccumulation du métal est déterminée par la méthode décrite par Srivastava et al. (2011). Les souches résistantes aux métalloïdes (H2, H5) sont ensemencées sur gélose Sabouraud sans métal, à 28° C pendant 96 h. Les cultures obtenues servent d'inoculum pour les tests de toxicité.

Pour la préparation des aliquotes, des disques (0,5 cm de ϕ) des mycoendophytes tests sont ensemencés dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de bouillon Sabouraud tamponné (tampon citrate 50 mM à pH 6,4) supplémenté à différentes concentrations métalliques à savoir : 5, 10, 20, 30, 40, 50 mM en Sb pour les deux souches ; 5, 10, 20, 30 ppm d'As pour H2 et 100, 150, 200, 250 ppm de Sb pour H5. Les cultures sont incubées à 30° C pendant 7 jours dans un incubateur rotatif (New Brunswick Scientific, EDISON, NJ.USA) à 175 rpm (Mukherjee et al., 2010).

La biomasse est récupérée après la durée d'incubation, filtrée sur le papier Watman N°01, lavée avec de l'eau désionisée stérile afin d'éliminer les résidus du milieu de culture. Les biomasses récupérées servent pour les dosages des métalloïdes et la détermination de leurs poids sec après séchage pendant 72 h à 65° C. Toutes les expériences sont faites en trois répliques.

8. Méthodes de dosage des métalloïdes

8.1 Minéralisation par digestion acide au micro-ondes

Les biomasses récupérées sont séchées à 65° C pendant 72 h, puis broyées en fine poudre à l'aide d'un mortier. Ainsi 750 μ L d'acide nitrique à 68% (forme pure) et 250 μ L d'H₂O₂ à 30% ont été ajoutés à 10 g de chaque échantillon dans des tubes en Quartz. Après 30 min de réaction sous sorbonne, les aliquotes ont été digéré à chaud dans des récipients en téflon à une grande pression dans un four à micro-ondes (BERGHOF-Speedwave 2), selon les conditions décrites ci-dessous :

	1 ^{ère} étape	2 ^{ème} étape
Temps	25 mn	10 mn
T°	180° C	100° C
Puissance	99 %	99 %

A la fin de l'opération, les échantillons ont été de façon à être entre 5 et 10% d'HNO₃ final (dilution au 1/5 dans eau Milli-Q).

8.2 Analyses au Spectroscopie d'Emission Atomique (MP-AES)

Le MP-AES représente une nouvelle technique d'analyse élémentaire qui a été conçue pour améliorer les performances analytiques et la productivité, tout en diminuant les coûts d'exploitation en éliminant les besoins en gaz inflammables et / ou coûteux utilisés dans les techniques d'analyse élémentaire typiques. Le plasma fonctionne à base d'azote à partir d'un générateur d'alimentation en air et d'azote comprimé, ce qui entraîne une réduction significative des coûts d'exploitation. En outre, la conception de l'Agilent 4100 MP-AES réduit le nombre de consommables coûteux tels que les lampes à cathode creuses utilisées dans les techniques d'absorption atomique.

La technique MP-AES produit une gamme linéaire, des limites de détection et une vitesse d'analyse supérieure par rapport à la flamme de la spectroscopie d'absorption atomique classique. Le MP-AES est basé sur une technique d'émission atomique. Cette technique d'analyse élémentaire produit des spectres plus simples que l'ICP-OES et une plus grande sensibilité que la flamme AAS.

- Pour l'hybridation de l'antimoine et de l'arsenic, un agent réductant a été utilisé (1,5% NaBH₄ + 0,2% NaOH).
- Un prétraitement par (0,75 mol/L HCl + 0,1 mol/L Thiourée (X10)) a été utilisé pour tester les limites de détection pour ses deux métalloïdes.

Pour le passeur d'échantillon, le volume mort pour la seringue est de 700 µL.

Les concentrations des métalloïdes sont déduites à partir de courbes étalons données en annexe 3.

9. Méthodes de dosage biochimique

La biomasse d'*Aspergillus tubingensis* et *Fusarium oxysporum* est obtenue à partir des cultures submergées, dans bouillon Sabouraud modifié contenant (par litre de tampon citrate 50 mM pH 6,4 : 10 g peptone, et 20 g glucose). Un volume total de 50 mL du bouillon Sabouraud tamponné et supplémenté par différentes concentrations en antimoine (C₈H₄K₂O₁₂Sb₂ 3H₂O Sigma-Aldrich), à savoir (5, 10, 20 et 30 mM), arsenic (0, 5, 10, 15 et

20 mM), est transféré dans des Erlenmeyer de 250 mL. Le bouillon est inoculé avec des disques mycéliens d'*Aspergillus tubingensis* et de *Fusarium oxysporum*, puis incubé à 32°C pendant 96 h dans un incubateur rotatif à 175 rpm (New Brunswick Scientific, Co., Inc., NJ, USA). Le contrôle se fait par rapport au bouillon Sabouraud tamponné sans ajout de métalloïdes. La biomasse est récupérée après 96 h d'incubation, filtrée, rincée avec de l'eau bidistillée stérile, et conservée à -20° C jusqu'à l'utilisation (Mukherjee et al., 2010).

Les variations du pH avant et après la durée de croissance sont stabilisées par l'addition du tampon citrate au milieu de culture (Chakraborty et al., 2014).

9.1 Dosage du malonedialdéhyde (MDA)

Le MDA est dosé selon la méthode de Kosugi et Kikugawa (1985) afin d'évaluer le niveau de peroxydation des lipides. Le principe du dosage repose sur la réaction qui se produit entre le malondialdéhyde et l'acide thiobarbiturique (TBA) formant le dérivé coloré MDA-TBA₂, de couleur rouge absorbant à 532 nm.

0,5 g de la biomasse fraîche, broyée en poudre par l'azote liquide, est homogénéisée avec 5 mL d'une solution contenant de l'acide trichloroacétique (TCA) à 20% et de l'acide thiobarbiturique (TBA) à 0,5%. Le mélange est incubé à 95° C pendant 30 min et la réaction est arrêtée par immersion des tubes dans la glace. Le mélange refroidi est centrifugé à 5000×g pendant 10 min à 25° C. L'absorbance non spécifique à 600 nm est soustraite de l'absorbance à 532 nm et la concentration en MDA est déterminée par son coefficient d'extinction molaire 155 mM⁻¹ cm⁻¹. Elle est exprimée en µmol/g de biomasse fraîche.

9.2 Mesure de la teneur en H₂O₂

Les niveaux du peroxyde d'hydrogène sont déterminés selon la méthode de Velikova (2000). La biomasse est homogénéisée dans un bain de glace avec 5 mL de TCA 0,1% (w:v). L'homogénat est centrifugé à 12000×g pendant 15 min. 0,5mL du surnageant est ajouté à 10 mL de tampon phosphate 0,5 mM (pH 7,0) et 1 mL du KI 1M. L'absorbance est lue à 390 nm. Le taux de H₂O₂ est déterminé à partir d'une courbe d'étalonnage.

9.3 Mesure de la teneur en proline intracellulaire

La teneur en proline libre est déterminée par la méthode décrite par Troll et Luidsley (1955) : 0.1g de biomasse fraîche est broyée dans un bain de glace. 2 mL de méthanol 40% (v/v) sont ajoutés après incubation à 85° C pendant 60 min et refroidissement à température ambiante. 1 mL de la solution d'extraction est mélangé avec 2 mL d'acide acétique, 25 mg ninhydrine et 1 mL d'un mélange contenant : l'acide acétique, l'eau distillée et l'acide orthophosphorique (120 : 300 : 80). L'homogénat est porté à ébullition pendant 30 minutes et ensuite placé dans un bain de glace afin d'arrêter la réaction. Pour permettre la séparation des phases, le toluène est ajouté au mélange et agité vigoureusement. L'intensité de la couleur rouge de la phase supérieure est lue à 528 nm. La concentration de la proline intracellulaire est déterminée en utilisant le coefficient d'extinction $0,62 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ par rapport au poids frais.

9.4 Dosage des enzymes antioxydantes et des protéines

9.4.1 Préparation des aliquotes

Les échantillons destinés aux dosages des activités enzymatiques sont préparés selon le protocole décrit par Mukherjee et al. (2010) et Benhamdi et al. (2014).

La biomasse fraîche (0,5 g) est broyée en une poudre fine avec un mortier et écrasée sous l'azote liquide. Les protéines sont ensuite extraites à 4° C avec 3 mL de 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 $14000\times g$ et le surnageant est utilisé pour les dosages.

9.4.2 Catalase (CAT)

Le dosage de la catalase est réalisé selon la méthode de Chance et Maehly (1955). La décomposition du peroxyde d'hydrogène est déterminée par la diminution de l'absorbance à 240 nm ($\epsilon=39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Le mélange réactionnel contient 2,9 mL de 0,1 M tampon phosphate à pH 7,0 et 0,1 mL de peroxyde d'hydrogène à 20 mM. La lecture est effectuée à 240 nm directement après l'addition de l'extrait enzymatique, chaque minute, durant 2 ou 3 min au maximum.

9.4.3 Superoxyde dismutase (SOD)

L'activité de la SOD est déterminée selon la méthode de Marklund et Marklund (1974). Le principe repose sur la capacité d'inhibition de l'autoxydation du pyrogallol par la SOD à 420 nm.

Le dosage est réalisé dans un volume final de 3 mL. 2,85 mL de tampon Tris HCl (0,1M à pH 8,2) sont additionnés à 0,1 mL de l'extrait enzymatique, et 25 μ L de pyrogallol (24 mM préparé dans 10 mM de HCl). Après incubation de 30 s, le changement de l'absorbance est mesuré à 420 nm chaque minute, dans un intervalle de temps de 3 min. L'activité de la SOD est exprimée en Unité/mg de protéine. Une unité de l'activité de la SOD est définie comme l'enzyme qui causerait l'inhibition de 50 % de l'autoxydation du pyrogallol.

9.4.4 Peroxydase (POD)

Le dosage de la peroxydase est effectué selon la méthode de Chance et Maehly (1955). Le purpurogallin formé entre l' H_2O_2 et le pyrogallol, par l'action de la peroxydase, est déterminé par la mesure de l'absorbance à 420 nm contre un blanc.

0,5 mL de l'extrait enzymatique est ajouté au mélange réactionnel contenant 2 mL de tampon phosphate 0,1 M à pH 6,8 ; 1 mL de 0,01 M pyrogallol et 1 mL de 0,05 M H_2O_2 . Le mélange est incubé à 25° C pendant 5 min. La réaction est arrêtée par l'addition de 1 mL de 2,5N H_2SO_4 . Le blanc est préparé par l'addition de l'extrait enzymatique après H_2SO_4 . L'activité enzymatique est exprimée en Unité = 0.1 absorbance mn^{-1} mg^{-1} de protéine.

9.4.5 Ascorbate peroxydase (APX)

Le dosage de l'activité de l'ascorbate peroxydase est réalisé selon la méthode de Nakano et Asada (1980). La réaction est basée sur l'oxydation de l'ascorbate par l'ascorbate peroxydase en présence de H_2O_2 à 290 nm ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Le mélange réactionnel contient 4 μ L de 50 mM H_2O_2 et 40 μ L d'extrait enzymatique dans 956 μ L de tampon phosphate 50 mM à pH 7,0 contenant de l'ascorbate à 0,5 mM. La lecture se fait directement chaque minute durant 2 à 3 min au maximum. L'activité enzymatique est exprimée en $\mu\text{M mn}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de protéine.

9.4.6 Dosage des protéines

Les concentrations des protéines sont quantifiées selon la méthode de Lowry et al. (1951) en utilisant la BSA comme protéine étalon.

10. Analyse statistique

Les tests statistiques réalisés au cours de ce travail sont les moyennes \pm SEM de 3 répétitions. Les données ont été analysées à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur suivi par le test de *Tukey*. Le traitement des résultats est effectué à l'aide des logiciels XLStat752 (version 7.5) et un seuil de signification de $p < 0,05$.

Des associations univariées ont été mesurées à travers les corrélations marginales de *Pearson* entre les concentrations en antimoine et en arsenic, et chacune des autres variables incluses dans l'analyse.

Résultats et discussion

Chapitre 1 : Analyses microbiologiques

1. Composition spécifique de la mycoflore endophyte

Comme déjà évoqué dans le chapitre Synthèse Bibliographique, les endophytes fongiques ou bactériens qui envahissent les tissus vivants des plantes durant tout ou une partie de leur cycle de vie (Wilson, 1995). L'association entre la plante et l'endophyte est, le plus souvent, mutualiste. Des 300 000 espèces de plantes sur terre, chaque plante est l'hôte d'un ou de plusieurs endophytes (Muzzamal et al., 2012). Ces derniers ont été isolés à partir de nombreuses familles de plantes et leur potentiel à remédier la contamination des environnements par les polluants métalliques est actuellement largement étudiée.

Cependant, ce genre d'investigation n'a jamais été mené chez les espèces d'*Hedysarum pallidum* et *Lygeum spartum*.

La zone d'étude du présent travail est semi-aride située, à Oum el Bouaghi (Nord-Est Algérien), la collecte des plantes *Hedysarum pallidum* Desf et *Lygeum spartum* L ne présentant aucun dommage visible, s'est faite en hiver (Février). Ces espèces ont été collectées dans le but de mettre en évidence des mycoendophytes à partir de leur système racinaire.

A l'issue de la mise en culture des fragments des deux espèces végétales : *H. pallidum* et *L. spartum*, la présence des champignons endophytes chez les deux espèces végétales a été démontrée. En revanche la mise en culture de l'eau de rinçage des racines n'a pas présenté de développement fongique, ce qui signifie que tout champignon émergeant des segments provient des tissus internes de la plante et que ce n'est pas un épiphyte (Figure 5).

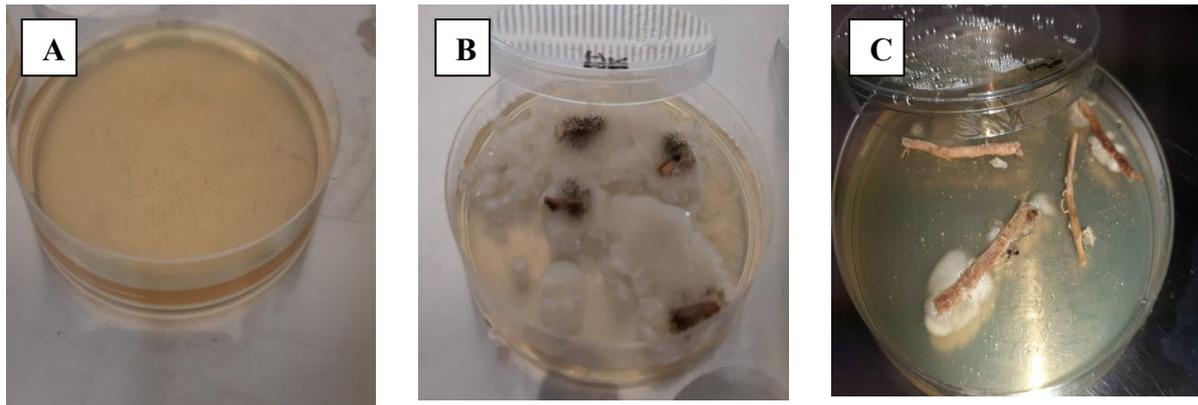


Figure 5 : Développement mycoendophytes : (A) : Témoin négatif de l'eau de rinçage, (B) : segments racinaires d'*H. pallidum*, (C) : segments racinaires de *L. spartum*

La fréquence de colonisation (FC) a été calculée et utilisée pour démontrer le degré d'infection des deux plantes par des mycoendophytes. Cette fréquence exprimée en pourcentage est présentée dans le tableau 6 et la figure 6. La fréquence d'isolement d'individu (FI) dans le tableau 6 et la figure 6 a été calculée afin de montrer la richesse en mycoendophytes des deux plantes.

Tableau 6 : Fréquence de colonisation (FC %) et fréquence d'isolement d'individus chez *Hedysarum pallidum* Desf et *Lygeum spartum* L.

	<i>Hedysarum pallidum</i> Desf			<i>Lygeum spartum</i> L		
	Nombre de taxons	FI	FC%	Nombre de taxons	FI	FC%
Racine 1	2	0,16	33,33%	6	0,50	100%
Racine 2	3	0,25	41,66%	5	0,41	100%
Racine 3	6	0,50	66,66%	5	0,41	75%
Racine 4	4	0,33	58,33%	8	0,66	100%
Racine 5	5	0,41	50%	7	0,58	100%
Racine 6	8	0,66	66,66%	9	0,75	100%
Racine 7	6	0,50	100%	7	0,58	100%
Racine 8	12	1,00	100%	8	0,66	100%
Total	46	0,47	64,58%	55	0,57	96,87%

Le tableau 6 et la figure 6 montrent que la fréquence de colonisation d'*H. pallidum* est proche de 65% pour l'ensemble des racines. Cependant pour les racines 7 et 8 d'*H. pallidum* la fréquence de colonisation est de 100% comparativement avec les autres racines dont la fréquence varie entre 33 % et 67%.

Pour *Lygeum spartum*, une FC de 100% est notée pour la majorité des racines, à l'exception de la racine 3 qui présente une fréquence de 75%. Les mêmes, tableau et figure

illustrant la fréquence d'isolement d'individu des deux espèces végétales, présentent une FI qui varie entre 0,16 à 1,00 et entre 0,41 à 0,75 pour *H. pallidum* et *L. spartum* respectivement.

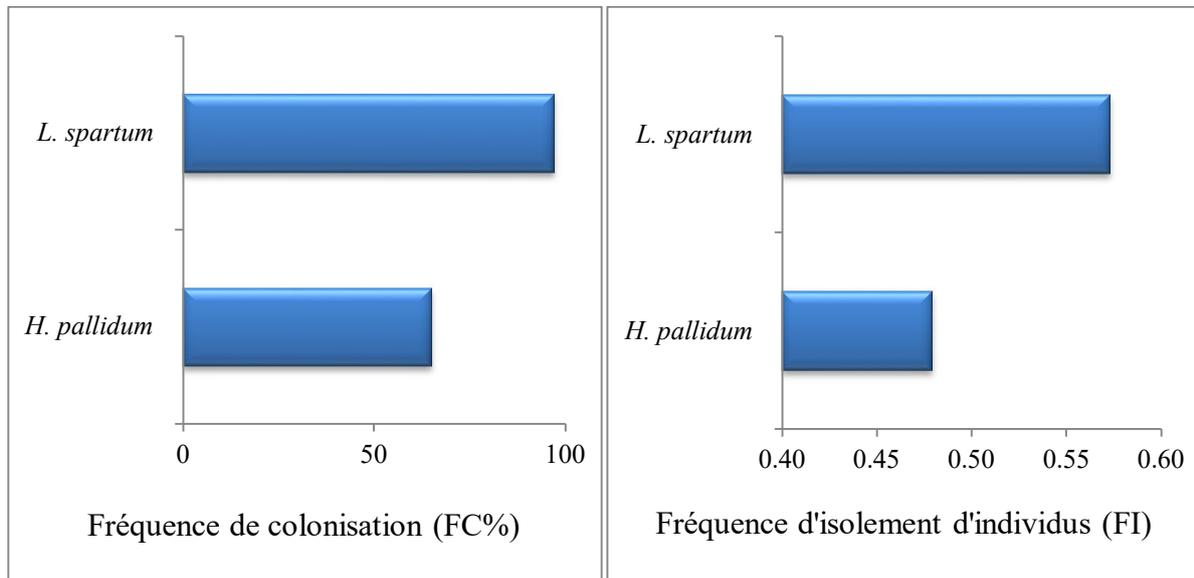


Figure 6 : Fréquence de colonisation (%) et Fréquence d'isolement d'individus des champignons endophytes chez *Hedysarum pallidum* Desf et *Lygeum spartum* L.

2. Composition spécifique des isolats fongiques endophytes

Les mycotaxons récupérés d'*Hedysarum pallidum* Desf et *Lygeum spartum* L sont identifiés sur la base des caractères cultureux et morphologiques des formes reproductrices. Vingt-quatre (24) isolats fongiques ont été obtenus dont neuf (9) mycotaxons sont identifiés à partir de la première espèce végétale et quinze (15) mycotaxons sont isolés de la deuxième espèce (Tableau 7).

Tableau 7 : Composition générale de la mycoflore endophyte détectée chez *H. pallidum* et *L. spartum*.

Espèce végétale	Mycotaxons	Classe
<i>H. pallidum</i>	Champignons mitosporiques	Eurotiomycètes
	<i>Aspergillus sp. 1</i>	
	<i>Aspergillus niger</i>	
	<i>Aspergillus terreus</i>	
	<i>Aspergillus flavus</i>	
	<i>Aspergillus candidus</i>	
	<i>Aspergillus sp. 2</i>	
	<i>Aspergillus sp. 3</i>	
	<i>Aspergillus sp. 4</i>	
	<i>Aspergillus sp. 5</i>	
	<i>Aspergillus sp. 6</i>	
	<i>Aspergillus sp. 7</i>	
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	
	<i>Penicillium sp. 1</i>	
	<i>Penicillium sp. 2</i>	
	<i>Penicillium sp. 3</i>	
	<i>Penicillium sp. 4</i>	
	<i>Penicillium sp. 5</i>	
	<i>Penicillium sp. 6</i>	
	<i>Fusarium solani</i>	Sordariomycètes
	<i>Fusarium sp. 1</i>	
	<i>Fusarium oxysporum</i>	
	<i>Fusarium sp. 2</i>	
	<i>Trichoderma sp. 1</i>	
	<i>Trichoderma sp. 2</i>	
	<i>Trichoderma sp. 3</i>	
<i>Chaetomium sp.</i>		
<i>Curvularia sp.</i>	Dothiomycètes	
Non identifié	-	
Formes stériles	-	
<i>Mycélium stérile (Ms. 1).</i>		
<i>Mycélium stérile (Ms. 2).</i>		
<i>L. spartum</i>	Champignons mitosporiques	Eurotyomycètes
	<i>Aspergillus terreus</i>	
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	
	<i>Aspergillus sp. 1</i>	
	<i>Aspergillus sp. 2</i>	
	<i>Aspergillus sp. 3</i>	
	<i>Aspergillus sp. 4</i>	
	<i>Aspergillus sp. 5</i>	
	<i>Aspergillus sp. 6</i>	
	<i>Aspergillus sp. 7</i>	
	<i>Aspergillus sp. 8</i>	
<i>Penicillium sp. 1</i>		

	<i>Penicillium sp. 2</i>	
	<i>Penicillium sp. 3</i>	
	<i>Penicillium sp. 4</i>	
	<i>Penicillium sp. 5</i>	
	<i>Talaromyces sp.</i>	
	<i>Paecilomyces sp.</i>	
	<i>Aletrnaria alernata</i>	Dothiomycètes
	<i>Bipolaris sp.</i>	
	<i>Fusarium sp.</i>	Sordariomycètes
	<i>Mucor sp.</i>	Mucormycotina
	<i>Non identifié (N.I. 1)</i>	-
	<i>Non identifié (N.I. 2)</i>	
	Formes Stériles	
	<i>Mycélium stérile (MS. 1).</i>	
	<i>Mycélium stérile (MS. 2).</i>	-
	<i>Mycélium stérile (MS. 3).</i>	
	<i>Mycélium stérile (MS. 4).</i>	
	<i>Mycélium stérile (MS. 5).</i>	

D'après les résultats du tableau, une diversité quantitative et qualitative de la mycoflore endophyte est révélée pour les deux espèces végétales *H. pallidum* et *L. spartum*. Un nombre très important de mycoendophytes isolés (201 taxons) a été noté. Pour *H. pallidum*, le groupe des champignons mitosporiques est spécifiquement de la classe des Eurotiomycètes contenant les genres : (6) *Penicillium* et (12) *Aspergillus*, avec une prédominance de ce dernier, suivis de la classe des Sordariomycètes (4 *Fusarium*, 3 *Trichoderma*, et 1 *Chaetomium*), puis vient la classe des Dothiomycètes avec un seul genre *Curvularia*, puis une autre classe contenant un seul genre non identifié, et enfin deux formes de mycélium stérile.

Quant au *L. spartum*, il contient 4 genres dans la classe des Eurotiomycètes, 10 genres *Aspergillus*, 5 genres *Penicillium*, 1 genre *Talaromyces*, et 1 genre *Paecilomyces*, suivi par la classe des Dothiomycètes contenant 1 genre *Aletrnaria*, et 1 genre *Bipolaris*. Vient ensuite la classe des Sordariomycètes avec 1 genre *Fusarium* ; puis la classe des Mucomycotina avec 1 seul genre *Mucor* ; enfin une classe comprenant deux genres non identifiés et 5 formes de mycélium stérile.

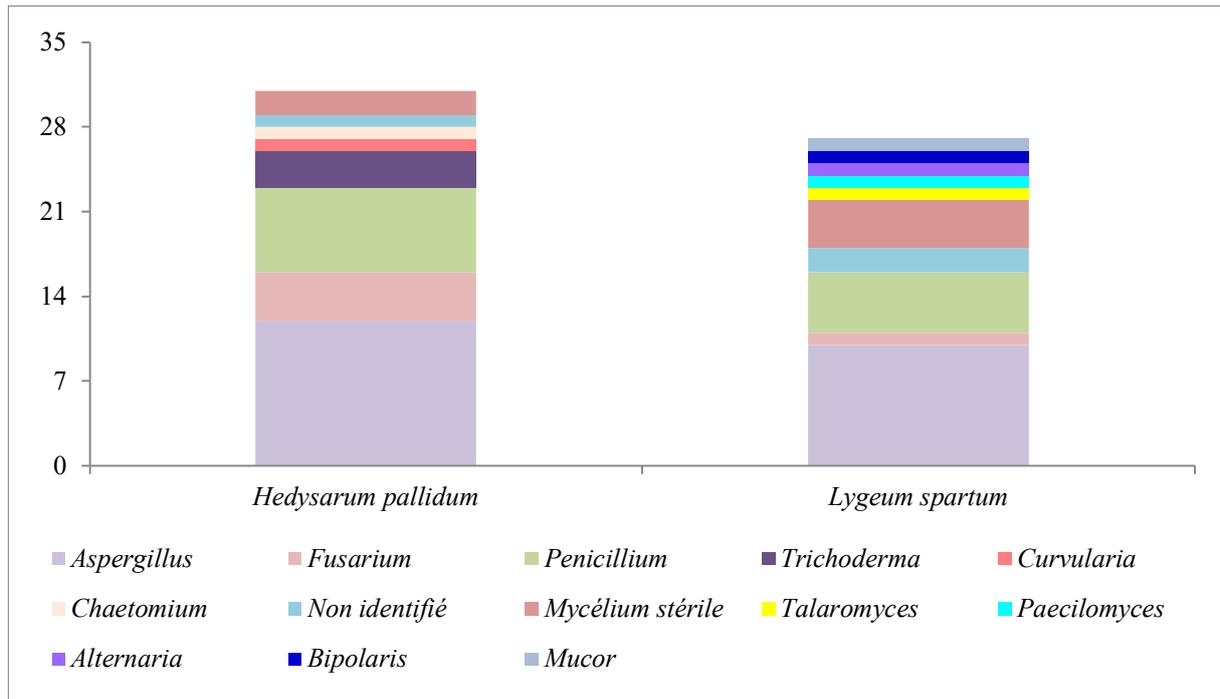


Figure 7 : Composition spécifique des mycotaxons endophytes détectés chez les deux espèces végétales

Un total de 201 isolats fongiques a été récupéré à partir de 192 segments des racines des deux espèces, avec 71 et 130 isolats provenant respectivement d'*H. pallidum* et *L. spartum* (Figure 8, 9)

Pour *Hedysarum pallidum*, sur 71 taxons (Figure 8), une prédominance du genre *Aspergillus* a été notée avec une fréquence de 59%, regroupant 12 espèces différentes : *A. terreus* (31%) la plus dominante, suivie de l'espèce *A. niger* (24%), vient l'espèce *A. sp. 1* (14%), puis le groupe d'*A. candidus*, *A. sp. 2*, *A. sp. 5*, *A. sp. 6* présentant la même fréquence (5%), et le groupe d'*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. sp. 3*, *A. sp. 4*, *A. sp. 7* avec une fréquence de (2%).

Le genre *Penicillium* présente une fréquence de 15,5% renfermant 7 espèces distinctes, dont une prédominance de l'espèce de *P. sp. 4* (36%), suivie de *P. sp. 6* (18%), puis viennent les autres espèces avec la même fréquence (9%) pour chacune.

Le genre *Fusarium* montre un pourcentage de 14% regroupant 4 espèces différentes : une prédominance de *F. solani* (40%), suivie par *F. oxysporum* (30%) puis *F. sp. 2* (20%) et enfin *F. sp. 1* (10%).

Le genre *Trichoderma* exhibe une fréquence de 4%, renfermant 3 espèces distinctes à la même fréquence de 33%. La forme stérile représente un taux de 3%, qui englobe une même fréquence de 50% pour *Ms. 1* et *Ms. 2*.

Les genres *Curvularia*, *Chaetomium* et *N.I.* représentent le groupe minoritaire avec une fréquence de 1% comprenant une seule espèce pour chaque taxon.

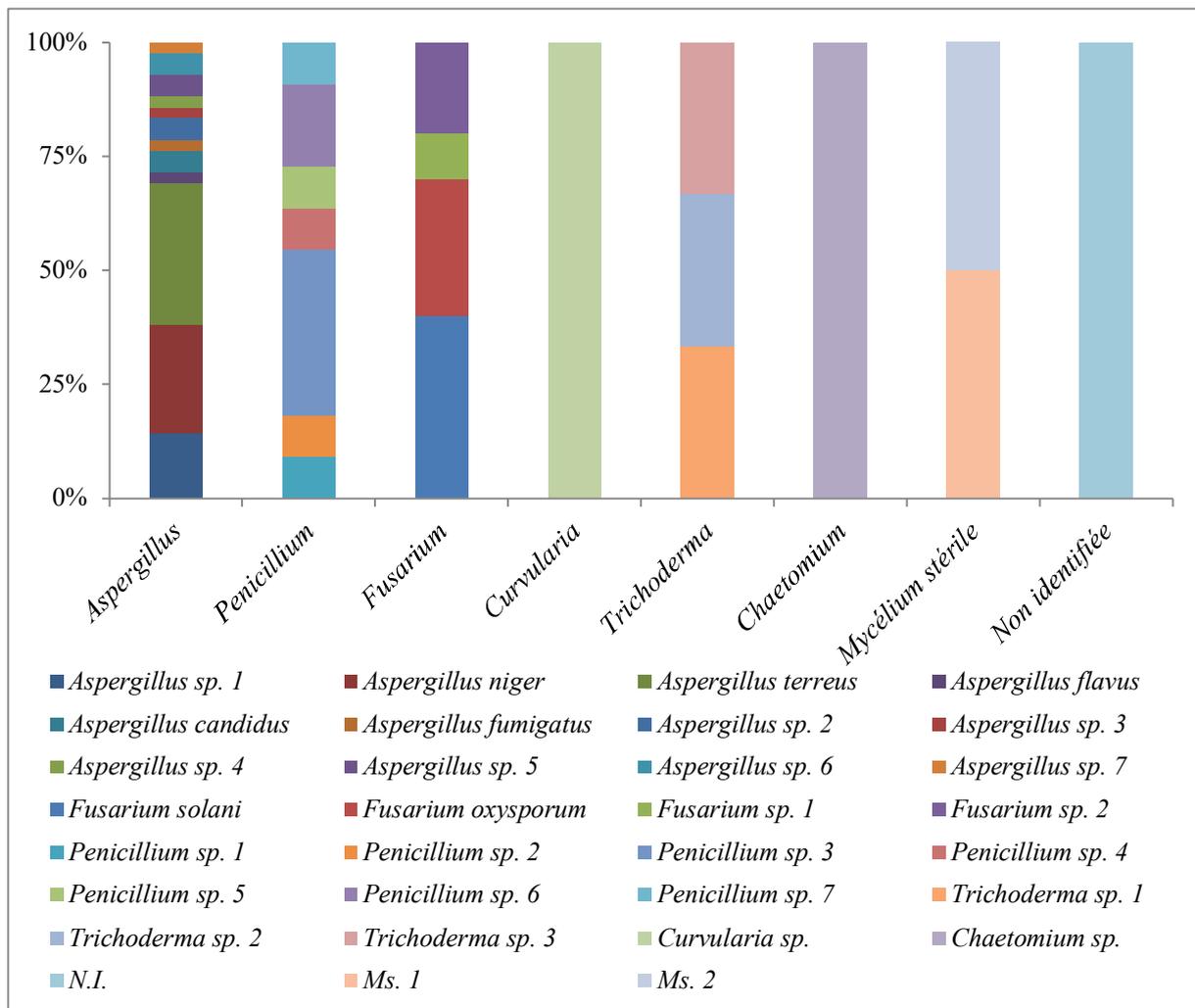


Figure 8 : Fréquences relatives de différents taxa de mycoendophytes isolés à partir des racines de d'*H. pallidum*

Pour *L. spartum*, sur les 130 taxons (Figure 9) c'est le genre *Aspergillus* qui domine avec une fréquence de 61%, renfermant 10 espèces distinctes : *A. terreus* la plus fréquente (30%), suivie par *A. sp. 2* (20%), *A. sp. 1* (16%), *A. sp. 10* (13%), puis *A. sp. 3*, *sp. 7*, *sp. 8* avec (4%), et en dernier *A. fumigatus* et *A. sp. 4* (1%).

Résultats et discussion

Le genre *Penicillium* se trouve à la fréquence de 14% comprenant 5 espèces distinctes : *P. sp. 5*, l'espèce majoritaire avec (67%) ; puis *P. sp. 3*, *sp. 4* (11%), puis en dernier *P. sp. 1* et *sp. 2* (6%) pour chacune.

Le groupe des mycéliums stériles présente une fréquence de 13% répartie en 4 espèces différentes : l'espèce *Ms. 1* ayant une fréquence de 65%, *Ms. 3* de 24% puis *Ms. 2* et *Ms. 4* avec 6% pour chacune.

De plus, le groupe des *N. I* montre une fréquence de 2%, renfermant 2 espèces différentes avec une fréquence de 50% pour chacune.

Le genre *Paecilomyces* de fréquence égale à 6%, est suivi du genre *Bipolaris* (2%) et des genres *Talaromyces*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Mucor* avec une même fréquence de 0,8% pour chacun, regroupant une seule espèce.

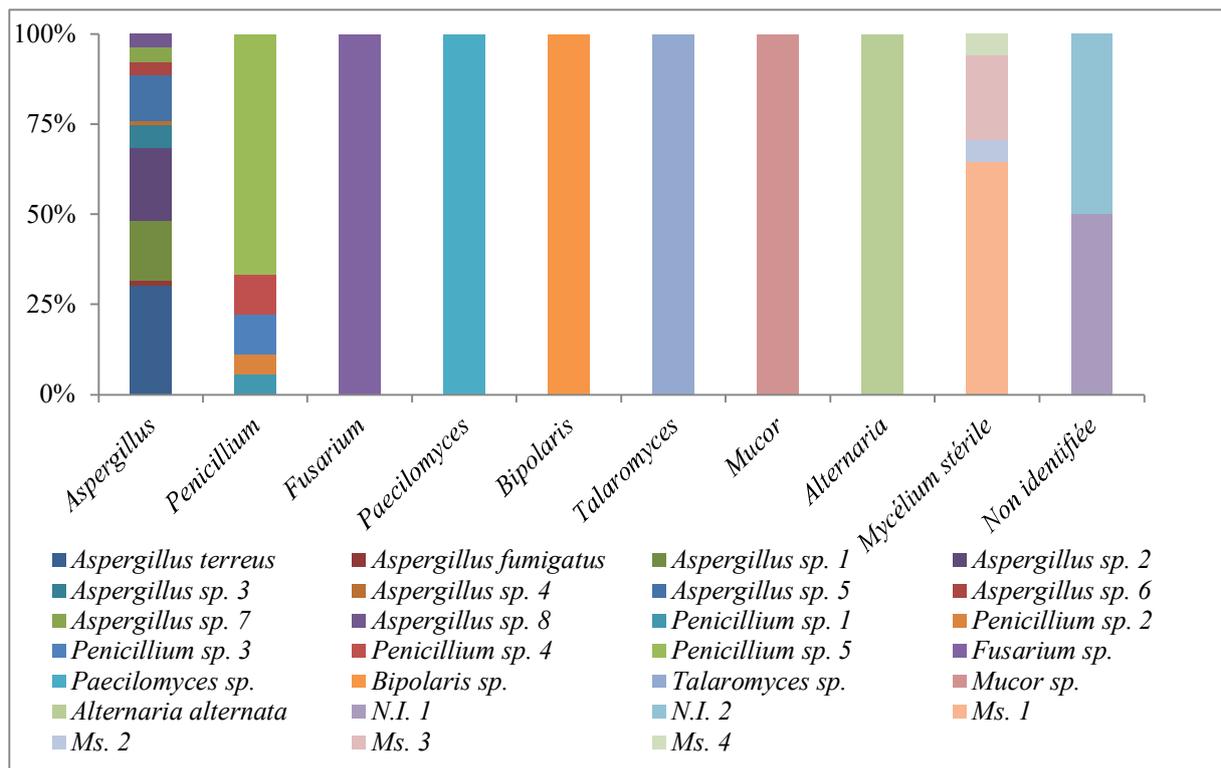


Figure 9 : Fréquences relatives de différents taxa de mycoendophytes isolés à partir des racines de *L. spartum*

Un statut quantitatif et qualitatif signifiant pour les deux plantes a été noté, la composition spécifique des mycotaxons endophytes permet d'observer une spécificité de souche pour chaque plante, les genres *Trichoderma*, *Curvularia* et *Choetomium* sont spécifiques pour *Hedysarum pallidum*, alors que *Talaromyces*, *Paecilomyces*, *Alternaria*,

Bipolaris et *Mucor* sont des genres spécifiques pour *Lygeum spartum*. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, et les Mycéliums stériles comptent les genres communs aux deux plantes. En revanche, au niveau espèces *Aspergillus terreus* et *Aspergillus fumigatus* comptent des espèces communes aux deux plantes, alors que *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum* sont des espèces spécifiques pour *Hedysarum pallidum* Desf. *Alternaria alternata* et *Paecilomyces sp.* sont également des espèces spécifiques pour *Lygeum spartum* L.

Discussion

Le présent travail a révélé, la présence de mycoendophytes associés aux racines des deux espèces végétales *Hedysarum pallidum* Desf., (*Fabaceae*) et *Lygeum spartum* L., (*Poaceae*) étudiées pour **la première fois en Algérie**. Les champignons endophytes forment un groupe polyphylétique très diversifié, regroupant principalement les espèces appartenant au phylum Ascomycota. La littérature scientifique sur les champignons endophytes se focalise en particulier sur deux aspects : pharmacologique par la capacité de produire de nombreuses molécules bioactives et écologique par leur impact sur la diversité végétale et le fonctionnement des écosystèmes (Ling, 2013).

Pour réaliser ces analyses microbiologiques, des racines de deux plantes steppiques saines poussant sur des déblais de mine d'antimoine ont été utilisées, mais qui présentent des systèmes de tolérance différents vis-à-vis de la contamination métallique.

La fréquence de colonisation enregistrée pour l'ensemble des racines d'*Hedysarum* varie entre 33 % et 100% (Tableau 6), ce qui conduit à supposer que cette distinction entre les fréquences de colonisation des différentes racines de la même espèce est liée à l'épaisseur, la longueur et l'âge de la racine. En revanche la fréquence de colonisation élevée allant de 97% à 100% chez *Lygeum* peut être due à la nature de son système racinaire, qui est un rhizome caractérisé par sa capacité à se régénérer par voie végétative (Djabeur et al., 2008), contrairement à celui d'*Hedysarum pallidum* qui présente un système racinaire pivotant.

D'après les résultats obtenus, les taux de colonisation et d'isolement d'un individu des racines par les mycoendophytes étaient différents entre les deux espèces, le FC étant de l'ordre de 65% et 97%, et le FI de 0,47 et 0,57. Les résultats de cette analyse corroborent les travaux de Gong et Guo (2009) qui ont trouvé une FC et une FI différentes entre deux espèces végétales collectées au mois d'Avril d'une même région, "Yunnan", en Chine, soit 80% et 0,62 dans les racines de *Dracaena cambodiana*, et 40% et 2,06 dans celles d'*Aquilaria sinensis*. Ces mêmes auteurs ont interprété cette différence de fréquence de colonisation et d'isolement par la nature des espèces végétales, la quantité d'échantillons testés et les milieux d'isolement.

Les travaux de Chareprasert et al. (2006) sur les mycoendophytes des feuilles de teck *Tectona grandis* L. et des arbres de pluie *Samanea saman* Merr. ont rapporté que la fréquence

de colonisation des feuilles matures des deux arbres est supérieure à celle des jeunes feuilles récemment levées, ce qui est conforme à la plupart des recherches entreprises sur d'autres plantes hôtes de différentes localités dans lesquelles les feuilles les plus anciennes ont tendance à favoriser une plus grande fréquence de colonisation interne par des champignons. Ceci a permis de suggérer que mêmes les anciennes racines peuvent présenter une fréquence de colonisation élevée.

La colonisation des racines par les mycoendophytes est significative sur le plan quantitatif. Du fait que l'ubiquité des endophytes est un aspect partagé entre les divers phytotaxons étudiés. Cet aspect peut être lié à une prédisposition génétique, anatomique, biochimique et physiologique de l'organe étudié, vis-à-vis des infections et colonisations endophytes (Huang et al., 2008). Pour d'autres auteurs tels que Mishra et al. (2012), la diversité et la fréquence de colonisation des champignons endophytes étaient principalement influencées par le type de tissu et la saison de la récolte. Aussi ces mêmes auteurs ont montré que la fréquence de la colonisation et la richesse en espèces étaient plus élevée dans les feuilles que dans les racines.

De même pour Reshma et al. (2017) qui ont rapporté que le taux de colonisation des endophytes d'*Achyranthes aspera* L. étaient respectivement de 95% au niveau des feuilles, 77,7% dans les tiges et 33,3% dans les racines, ils suggèrent que les feuilles peuvent être colonisées par des spores aériennes provenant de sources lointaines.

Ainsi que pour Fernandes et al. (2015) qui ont montré une diversité de mycoendophytes dans les feuilles que dans les racines avec des fréquences de (187 et 42) respectivement. Alors que des conditions environnementales uniformes et stables dans la rhizosphère pourraient être responsables d'une grande uniformité et d'une faible richesse en espèces dans les racines.

Le nombre de taxons endophytes isolés est très significatif (201 taxons), avec la prédominance des Eurotiomycètes pour les plantes considérées, en particulier *Aspergillus terreus* qui compte l'espèce commune aux deux plantes avec des fréquences de 31 et 30% pour *Hedysarum* et *Lygeum* respectivement. Les isolats décrits dans cette étude, appartiennent aux genres : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Chaetomium* comme signalé dans la littérature. D'ailleurs pour les travaux de Maciá-Vicente et al. (2008), et Khan et al. (2011a ; 2011b) ces genres d'endophytes racinaires sont les plus fréquents dans plusieurs

plantes, et semblent jouer un rôle potentiel dans la tolérance des plantes au stress abiotique et à leur croissance.

En effet, Khan et al. (2011) rapportent que l'association des plantes (*Glycine max*) avec l'endophyte *Penicillium* peut aider ces plantes à résister au stress environnemental (salinité) et à améliorer leur croissance.

Maciá-Vicente et al. (2008) montrent dans leur étude portant sur la biodiversité mycoendophyte isolée de la végétation de la Méditerranée, une prédominance des genres *Fusarium* et *Phoma*, suivie par *Aspergillus*, *Alternaria* et *Acremonium* et que les communautés mycoendophytes racinaires étaient influencées par le type de sol où poussaient leurs plantes hôtes, mais pas par leur localisation. Selon le même auteur, *Fusarium equiseti* a présenté une spécificité pour *Lygeum spartum* (Poaceae), ce qui ressort dans la présente étude, ainsi le genre *Fusarium* est un mycoendophyte commun entre les deux espèces végétales *Hedysarum pallidum* et *Lygeum spartum*.

D'après Clay (1993), la plante-hôte peut être à l'origine de certains métabolites secondaires qui peuvent non seulement inhiber la croissance des endophytes dans leurs tissus, mais également limiter leur propagation et même restreindre le nombre de taxons fongiques associés. Cette constatation peut être projetée sur les résultats de cette analyse pour expliquer le fait que certains taxons, tels que les Zygomycètes, sont pratiquement absents, une seule espèce de *Mucor* est présente chez *Lygeum spartum*.

Pour Sun et Guo (2012) la taille des fragments des plantes et le nombre d'échantillons influencent l'isolement et la diversité fongique. La majorité des mycoendophytes isolés dans la présente recherche sont rangés au sein du phylum Ascomycota (formellement les Deuteromycota). Pratiquement, une multitude d'études menées en la matière attestent que les Deutéromycètes représentent les formes fongiques asexuées, qui prédominent quel que soit le statut taxonomique de la plante-hôte (Marquez et al., 2007 ; Huang et al., 2008 ; Costa et al., 2012 ; Singh, 2013).

Les résultats obtenus de cette analyse concordent avec de nombreux travaux, telle l'étude de Mishra et al. (2012) portant sur les racines d'une plante médicinale *Tinospora cordifolia*, elle a trouvé une diversité fongique importante à savoir, *Chaetomium globosum*,

Alternaria alternata, *Aspergillus flavus*, *A. terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium sp*, *Trichoderma veridae*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. apicale*, et *Nigrospora oryzae*.

Les champignons mitosporiques appartenant au phylum Ascomycota sont considérés comme les plus prédominants dans la majorité des plantes colonisées par les endophytes fongiques. Cela est justifié via beaucoup d'études : Seena et Sridhar (2004) ; Khan et al. (2007) ; Mangunwardoyo et al. (2012) ; Han et al. (2013) ; Sharma et Kumar (2013) ; Shi et al. (2013) ; Suciati et Rahmansyah (2013) ; D'souza et Bhat (2013).

Il est à signaler qu'une majorité d'auteurs affilient les *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Acremonium*, *Paecilomyces* et autres à la classe des Hyphomycètes.

Les genres *Fusarium*, *Trichoderma* et *Chaetomium* sont les plus fréquemment isolés (Tejesvi et al., 2006), cette dominance de la classe des Hyphomycètes peut être attribuée à leur capacité de produire des spores asexuées abondantes, en permettant de coloniser rapidement leur hôte, comme énoncent Jena et Tayung (2013) pour *Solanum rubrum* et *Morinda pubescence* dont la composition fongique pour la première espèce est de 65% d'Hyphomycètes, 10% de Coelomycètes et 10% de mycéliums stériles ; tandis que celle de la deuxième plante est de 86% d'Hyphomycètes, 8% d'Ascomycètes, 4% de Coelomycètes et 16% de mycéliums stériles.

Les résultats obtenus par Fernandes et al. (2015) sur la biodiversité fongique endophyte dans les racines de Soja (*Glycine max*) montrent une prédominance de l'ordre des Hypocréales, représenté par *F. oxysporum* (50%), *F. solani* (19,04%) et *F. sp.* (7,14%) ; l'ordre des Pleosporales représenté par *Alternaria tenuissima*, *Alternaria sp.* (4,76%), *Cochliobolus geniculatus* (2,38%) et *Phoma sp.* (2,38%) ; ensuite l'ordre des Sordariales représenté par *Chaetomium funicola* et *Chaetomium sp.* (2,38%) et enfin l'ordre des Xylariales représenté par *Pestalotiopsis vismiaie* avec la même fréquence.

Huang et al. (2008) ont noté que les taxons *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Phoma*, *Phomopsis*, l'ordre des Xylariales, et les mycéliums stériles sont les plus dominants. Tan et al. (2011) qui travaillaient sur les racines de *Holcoglossum* (Orchidaceae), ont trouvé que tous les isolats appartiennent à quatre classes, à savoir les Sordariomycetes (41,30%), les Dothideomycetes (36,96%), les Agaricomycetes (17,39%), et les Leotiomycetes (4,35%).

Les genres *Fusarium*, *Trichoderma* et *Alternaria*, dans cette étude, qui sont isolés à partir des racines des deux plantes, sont des endophytes, ce qui corrobore de nombreux travaux qui ont rapporté que ces champignons peuvent être aussi de vrais endophytes (Impullitti et Malvick, 2013 ; Kumar et Kaushik, 2013 ; Firodiya et Tenguria, 2013 ; Leite et al., 2013 ; Pimentel et al., 2006 ; Rathod et Pawar, 2013 ; Roy et al., 2000), alors que ces mycètes sont fondamentalement des champignons phytopathogènes, et plus précisément les espèces *Fusarium spp.* (Chaverri et al., 2011 et Mahdich et al., 2014).

Les plantes étudiées *H. pallidum* et *L. spartum* poussant sur des sols fortement contaminés par les métaux lourds, en particulier l'antimoine et l'arsenic, présentent une très large diversité d'espèces mycoendophytes qui ont été isolées à partir de leurs systèmes racinaires. La présence d'espèces fongiques telles qu'*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* et *Paecilomyces* dans des sols riches en cuivre (Cu), cadmium (Cd), arsenic (As) et zinc (Zn) a été discutée par de nombreux auteurs : Zafar et al. (2007) ; Fazli et al. (2015). L'adaptation à de tels niveaux de métaux lourds pourrait jouer un rôle potentiel dans la remédiation des sites pollués par ces métaux, en particulier, les espèces du genre *Aspergillus* qui présentent une tolérance / résistance à des niveaux élevés présents dans l'environnement. Certaines souches de ce genre sont identifiées comme possédant des profils de résistance à une gamme de métaux lourds y compris le plomb (Pb), le cobalt (Co), le Cd et le Zn, pour Iram et al. (2015) ; le nickel (Ni) et le chrome (Cr) pour Congeevaram et al. (2007) ; et l'arsenic pour Maheswari et Murugesan (2009) ; Mukherjee et al. (2010) et Vala et Sutariya (2012).

D'autres espèces d'*Aspergillus* se sont également adaptées à des environnements fortement pollués en cuivre (Cu) (Iram et al., 2015 ; Luna et al., 2015) et en fer (Fe) (Dias et al., 2002). Leur présence sur ces sols peut être attribuée à leur grande adaptation et leur tolérance à des conditions environnementales et nutritionnelles extrêmes et variées (Gavrilescu, 2004 ; Anand et al., 2006 ; Safahieh et al., 2014).

Les résultats obtenus à partir des analyses microbiologiques, ont mis en évidence que les racines d'*Hedysarum pallidum* Desf. et *Lygeum spartum* L, constituent un habitat pour un groupe diversifié de mycoendophytes, pouvant jouer un rôle potentiel dans la tolérance de l'hôte végétal à la pollution par les métalloïdes.

3. Sélection des mycoendophytes résistants aux métalloïdes

Ce test a permis de sélectionner, parmi les mycoendophytes isolés à partir d'*Hedysarum pallidum* Desf. et *Lygeum spartum* L., une souche fongique résistante à des teneurs élevées en antimoine et en arsenic, afin d'évaluer sa capacité à lutter contre la toxicité de ces métalloïdes.

Parmi les deux cent un isolats mycoendophytes, deux sont parvenus à croître sur 500 mM Sb et 30 mM As (Figure 10), issus du système racinaire d'*H. pallidum*, sur gélose et bouillon Sabouraud, en formant un tapis mycélien sur les deux milieux de culture. Ces teneurs métalliques sont considérées comme des concentrations minimales inhibitrices (CMI), déterminée par l'absence de croissance au niveau de la plus faible concentration du métal. D'après la figure 10, les mycoendophytes hébergeant les racines d'*H. pallidum* montrent une haute résistance aux deux métalloïdes par rapport aux mycoendophytes hébergeant les racines de *L. spartum*.

La fréquence d'isolats endophytes des deux plantes en présence d'antimoine dans le milieu, est supérieure à celle de l'arsenic. Pour les mycoendophytes d'*H. pallidum*, la totalité de la communauté résiste à 2,5 mM de Sb et 79% pour As, alors que pour *L. spartum*, 78% de la population résiste à la même concentration de Sb et 27% pour As.

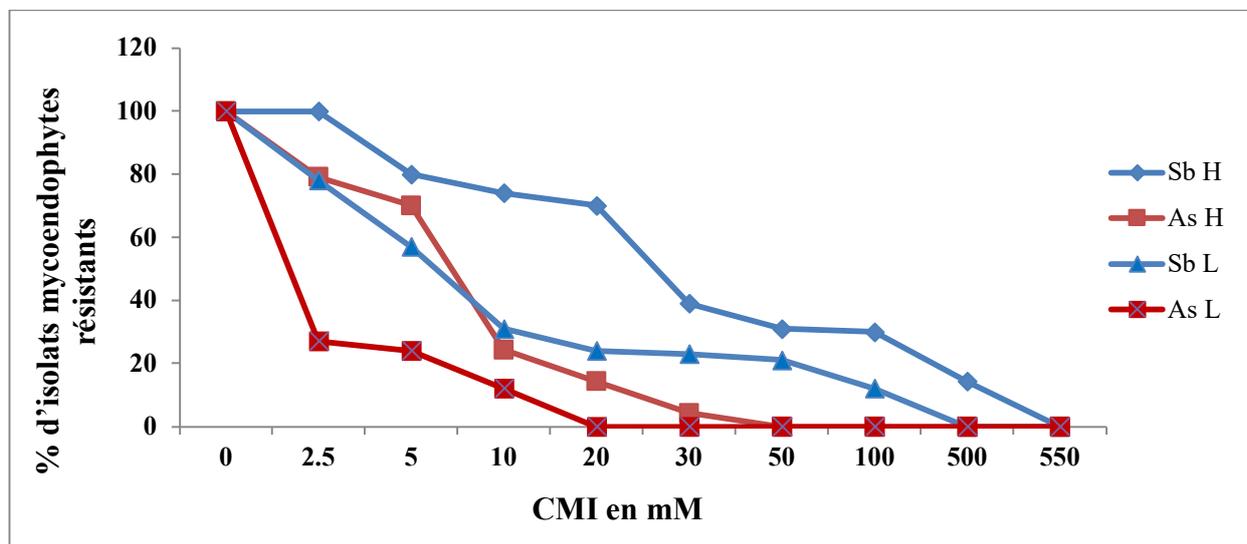


Figure 10 : Distribution des CMI d'antimoine et d'arsenic pour les 201 souches de mycoendophytes des deux plantes steppiques

A 10 mM Sb, une diminution de la fréquence de mycoendophytes des deux plantes a été constatée, alors que pour 10 mM As, une diminution très importante voire une chute brutale atteignant 24% et 12% de la fréquence de la population pour *H. pallidum* et *L. spartum* respectivement, a été notée.

A 20 mM As, la concentration minimale inhibitrice pour la totalité de la flore endophyte de *L. spartum* a été déterminée, alors que pour la flore endophyte d'*Hedysarum* 14% de sa population est conservée à la même concentration. A cette même concentration en Sb, la population endophyte des deux plantes résistent et parviennent à garder 70% et 24% de leur population respective.

Au-delà de 20 mM et particulièrement à 30 mM As, la concentration minimale inhibitrice pour l'arsenic a été déterminée, où une seule population appartenant au même groupe taxonomique qui correspond à la même espèce, a montré sa capacité à tolérer cette dose. En revanche cette population n'a pas pu se développer sur 50 mM As, cette dose peut être considérée comme létale. Donc la CMI pour cette population est située dans un intervalle entre 30 à 50 mM As, **50 > CMI_{As} > 30 mM** soit 40 mM As.

Quant à l'antimoine, à 100 mM, uniquement 30% et 12% de la population des deux plantes *H. pallidum* et *L. sparum* résistent à cette dose. Cependant, à 500 mM Sb, seuls 14% d'isolats mycoendophytes d'*Hedysarum pallidum* parviennent à croître. Cette population affiliée au même groupe taxonomique présente une seule espèce. Au-delà de cette concentration, c'est à dire 550 mM, une inhibition totale de la croissance a été notée, ce qui indique que cette concentration est létale, **550 > CMI_{Sb} > 500 mM**.

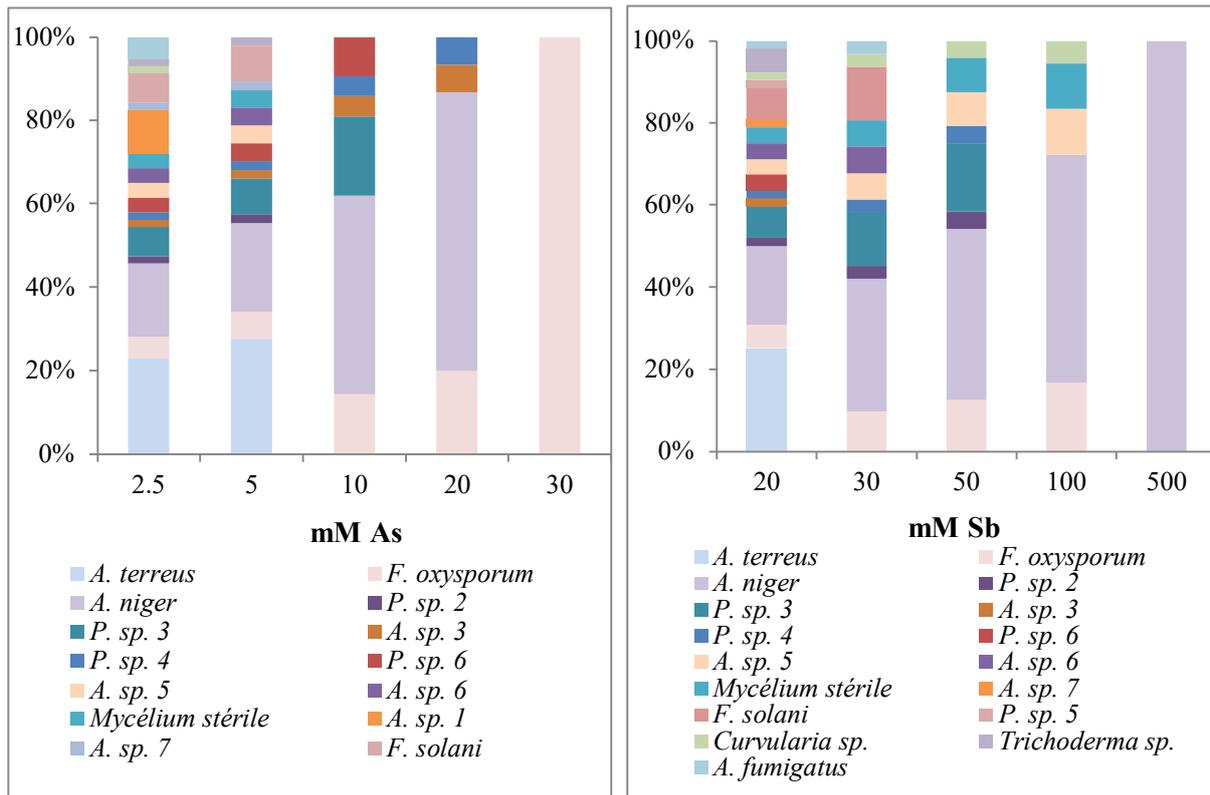


Figure 11 : Sélection des mycoendophytes d'*H. pallidum* résistants à As et Sb

Les figures (11 et 12), font ressortir les mycoendophytes résistants aux différentes concentrations d'As et Sb pour les deux plantes. Les deux mycoendophytes *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum* sont isolés à partir des racines d'*H. pallidum*. La figure 11 montre que le groupe taxonomique qui correspond à *F. oxysporum* résiste jusqu'à 30 mM As et 100 mM Sb, en revanche le groupe d'*A. niger* résiste jusqu'à 20 mM As et 500 mM Sb.

A de faibles doses d'As et de Sb, la majorité des mycoendophytes d'*H. pallidum* parviennent à pousser sur gélose et bouillon Sabouraud, contrairement aux mycoendophytes de *Lygeum spartum*, pour le groupe taxonomique, *Aspergillus sp. 5*, commun aux deux plantes, qui résiste jusqu'à 5 mM As et 50 mM Sb. En contraste aux autres mycoendophytes, chacun présente un profil de résistance indépendant.

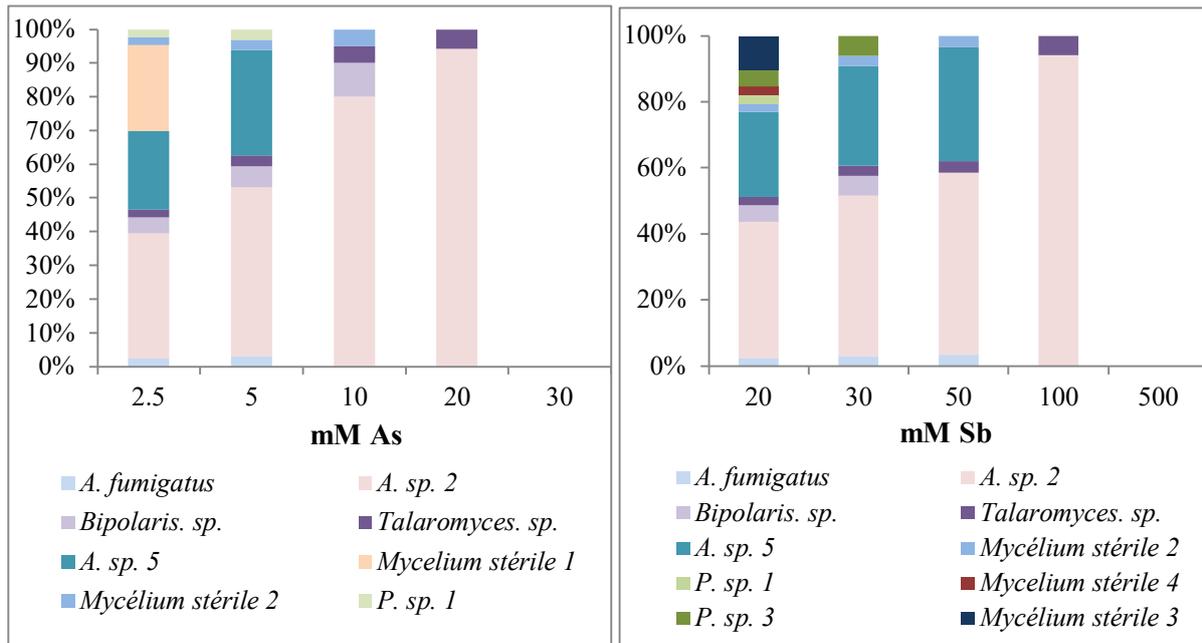


Figure 12 : Sélection des mycoendophytes de *L. spartum* résistants à As et Sb

D'après la figure 12, la flore mycoendophyte du *L. spartum* est sensible aux deux métalloïdes en comparaison avec celle d'*H. pallidum*. De plus, *Talaromyces sp.* et *Aspergillus sp. 2*, présentent le même profil de résistance vis-à-vis d'As (20 mM) et de Sb (100 mM). Le mycélium stérile 1, s'est montré résistant uniquement à l'arsenic jusqu'à 2,5 mM. Or, aucun mycoendophyte de *Lygeum spartum*, n'a poussé à 30 mM As et 500 mM Sb.

4. Identification des mycoendophytes résistants à l'antimoine et l'arsenic

D'après les résultats obtenus du screening des mycotaxons résistants aux métalloïdes, une identification des caractères cultureux, morphologiques et sur le plan moléculaire a été réalisée.

Il est important de signaler que dans une partie précédente, tous les mycoendophytes ont été identifiés en se basant sur les caractères cultureux et morphologiques, en utilisant les clés de détermination décrites par Botton et al. (1990). L'étude de ces caractères a été réalisée sur une culture de 7 jours à 28°C sur milieu PDA.

En se basant sur le profil de résistance à l'antimoine, sur les caractères cultureux et morphologiques, il s'est avéré que toutes les espèces mycoendophytes du groupe taxonomique comprenant 10 espèces, correspondent à *Aspergillus niger*. En l'occurrence,

toutes les espèces qui présentent les mêmes caractéristiques macroscopiques, microscopiques et résistance vis-à-vis de l'arsenic sont affiliées à *Fusarium oxysporum*.

En se basant sur les caractères cultureux et morphologiques, le groupe taxonomique d'*A. niger* portant la codification (H2), présente les caractères suivants (Figure 13) :

- Caractères cultureux
 - ✓ Face : colonies d'abord blanches, puis jaunes, et enfin granuleuses noires.
 - ✓ Revers : blanc crème à jaune pâle.
 - ✓ Croissance rapide de 2 à 3 jours. Au 7^{ème} jour de culture, envahissement total de la boîte.
- Caractères morphologiques :
 - ✓ Conidiophore : long, lisse et hyalin.
 - ✓ Vésicule : globuleuse.
 - ✓ Phialides : insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées sur tout le pourtour de la vésicule.
 - ✓ Conidies : sphériques, brunes, et échinulées.



Figure 13 : Caractères cultureux et morphologique du mycoendophyte résistant à l'antimoine

Pour le groupe taxonomique *Fusarium oxysporum* portant la codification (H5), les caractères sont les suivants (Figure 14) :

- Caractères cultureux
 - ✓ Face : colonies duveteuses blanches, puis devenant roses violacées.
 - ✓ Revers : couleur identique à l'avert blanc rosé.
 - ✓ Croissance rapide. Au 7^{ème} jour de culture, envahissement presque total de la boîte.

- Caractères morphologiques :
 - ✓ Conidiophore : hyalin, court et plus ou moins ramifié.
 - ✓ Phialides : monophialides courtes et solitaires.
 - ✓ Macroconidies : rares, avec 3 à 4 logettes.
 - ✓ Microconidies : très abondantes, unicellulaires et asymétriques, d'aspect cylindrique et ellipsoïdale.
 - ✓ Chlamydospores: rarement observées.

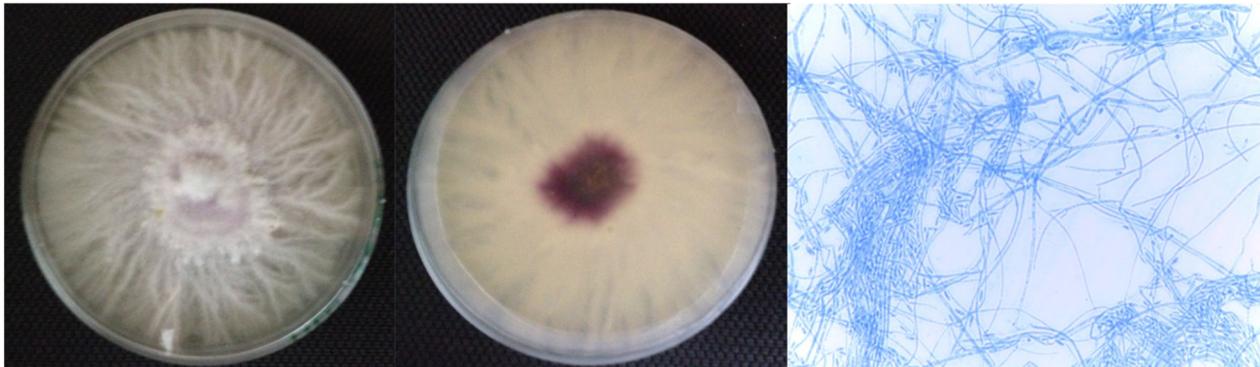


Figure 14 : Caractères culturels et morphologiques du mycoendophyte résistant à l'arsenic

Pour une meilleure identification des mycoendophytes résistants aux métalloïdes, l'outil moléculaire a été utilisé. Pour cela, la région ITS de l'ADN ribosomal a été choisie, car elle est le marqueur officiel du *DNA barcoding*, pour l'identification des champignons au niveau de l'espèce.

Les régions ITS 1, ITS2 et 5,8S des ADN ribosomaux ont été amplifiées par PCR en utilisant diverses combinaisons de couples d'amorces afin de discriminer les souches en question. Les amplifiats obtenus sont séparés sur gel d'agarose 1,2% pour vérifier l'efficacité des amorces utilisées.

D'après la figure 15 les couples d'amorce ITS1/ITS4, ITS86F/ITS86R, et ITS2/ITS3 n'ont pas donné d'amplifiats, ce qui signifie que ces amorces ne sont pas spécifiques pour l'amplification de la région ITS de ces deux mycoendophytes.

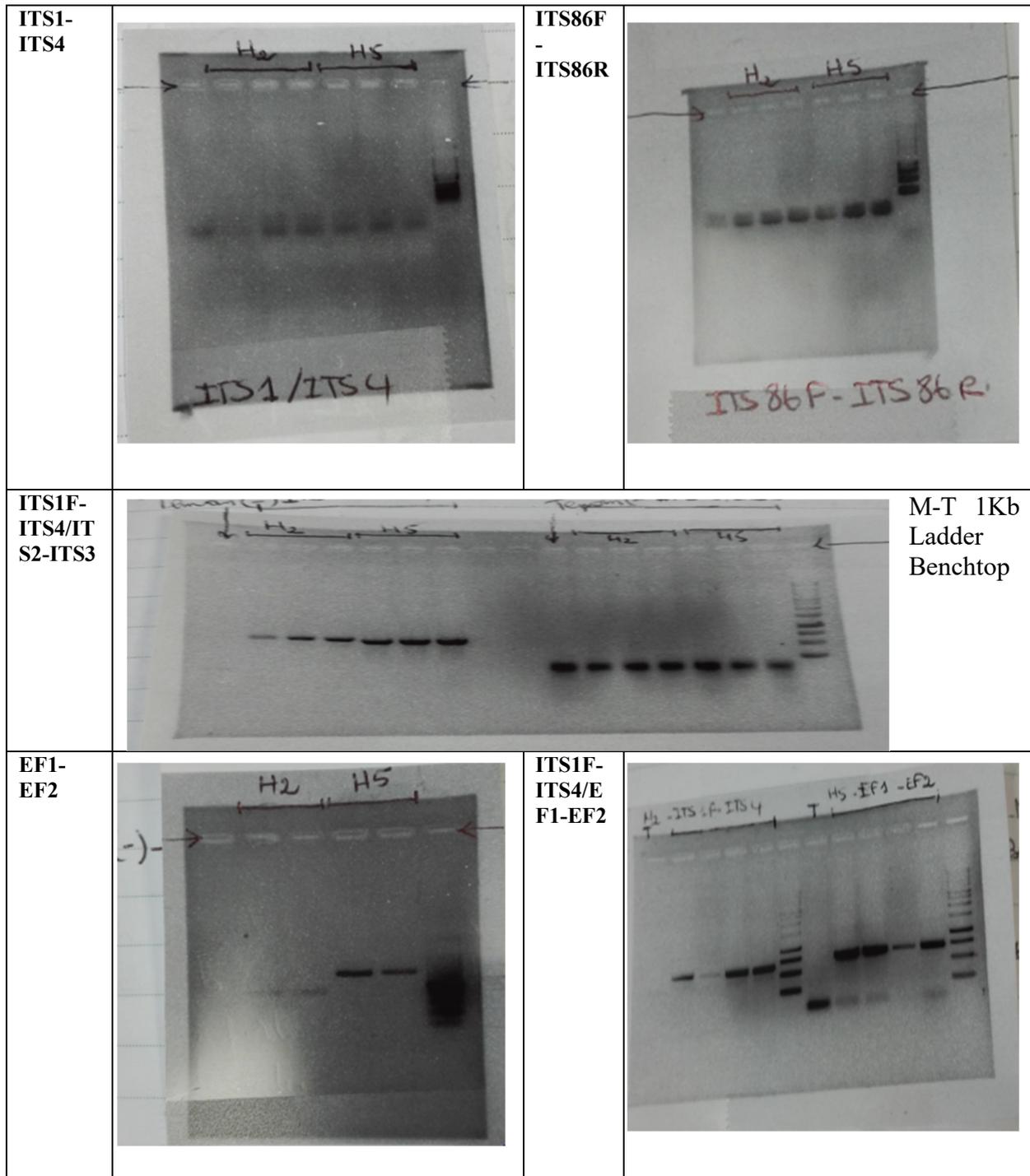


Figure 15 : Test confirmatif de l'efficacité des amorces spécifiques sur gel d'agarose 1,2%

En revanche, seuls les couples d'amorces ITS1F/ITS4 pour le mycoendophyte (H2) *Aspergillus niger* et EF1/EF2 pour le mycoendophyte *Fusarium oxysporum* ont donné des résultats positifs, avec des produits PCR, de 750 pb pour EF1/EF2 et entre 500-750 pb pour ITS1F/ITS4 (Figure 15).

Pour le séquençage, une PCR quantitative a été faite avec le couple d'amorce ITS1F/ITS4, EF1/EF2, les amplifiats non purifiés pour les deux mycoendophytes résistants à As et Sb sont dosés au NanoDrop et doivent avoir une concentration de 4 ng/μl.

La comparaison des séquences des facteurs d'élongation obtenues à celles de la base de données *GenBank*, a permis d'affilier le mycoendophyte (H5) à *Fusarium oxysporum* avec 99,69% de similarité. Les séquences de la région ITS de l'endophyte (H2) ont permis de l'affilier à *Aspergillus niger* avec un score de 99,83%, à *Aspergillus tubingensis* avec un score de 99,83%, à *Endophytic fungi* avec le même score, et à *Aspergillus sp.* avec un score de 100% (Tableau 8).

Tableau 8 : Affiliations phylogénétiques des mycoendophytes résistants à Sb et As

Mycoendophytes	PCR			
	Genres	Identité	Espèces apparentées	N° d'accession
H2	<i>Aspergillus</i>	99,83%	<i>Aspergillus niger</i>	KT898789.1
		99,83%	<i>Aspergillus tubingensis</i>	KU847852.1
		99,83%	<i>Fungal Endophyte</i>	KT202946.1
		100%	<i>Aspergillus sp.</i>	KF961004.1
H5	<i>Fusarium</i>	99,69%	<i>Fusarium oxysporum</i>	KF913725.1
		99,54%	<i>Fusarium oxysporum</i>	KT323866.1

Pour mieux discriminer le mycoendophyte (H2), une amplification par PCR en utilisant des amorces spécifiques s'impose, dont NIG1/NIG2 amplifiant uniquement l'ADN d'*A. niger* et TUB1/TUB2 amplifiant uniquement l'ADN d'*A. tubingensis* du gène Calmodulin (*CaM*).

La séparation des produits PCR par électrophorèse donne des résultats positifs uniquement pour le couple d'amorce TUB1/TUB2 avec une taille d'amplicons de 506 pb, ce qui suggère que la souche pourrait être un *Aspergillus tubingensis* (Figure 16).

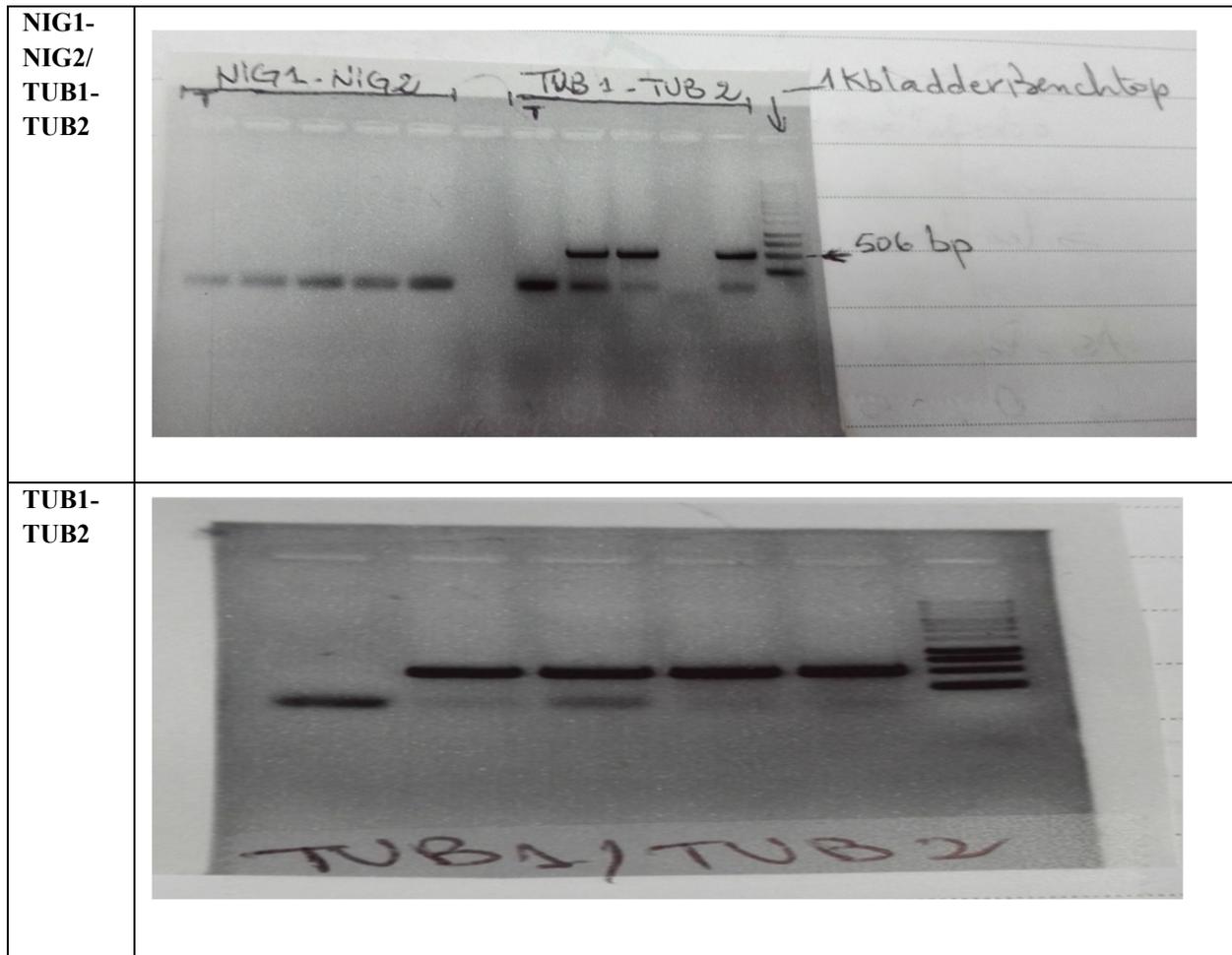


Figure 16 : Discrimination primaire du mycoendphyte H2 avec les amorces spécifiques

Les amplifiats non purifiés du mycoendphyte (H2) ont été séquencés au Laboratoire Eurofins/Genomics, et les séquences obtenues ont été comparées avec celles des organismes apparentés sur BLASTn. Il en ressort que les séquences de cette souche (H2) étaient homologues à 100% à *A. tubingensis* MG832135.1, MH644927.1, et KC796380.1.

L'affiliation taxonomique et les séquences éditées ont été alignées sur les séquences de la base de données Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Pour la construction de l'arbre phylogénétique, les séquences étroitement apparentées dans *GenBank* ont été sélectionnées.

L'alignement multiple des séquences a été réalisé à l'aide de MUSCLE (Edgar, 2004) intégré à MEGA (7.0.14) (Tamura et al., 2013), les dendrogrammes de phylogénie ont ensuite été construits par la méthode des distances (Neighbor-joining), en utilisant le modèle de substitution p-distance (d: Transitions + Transversions) et 1000 réplifications bootstrap dans MEGA (Figure 17).

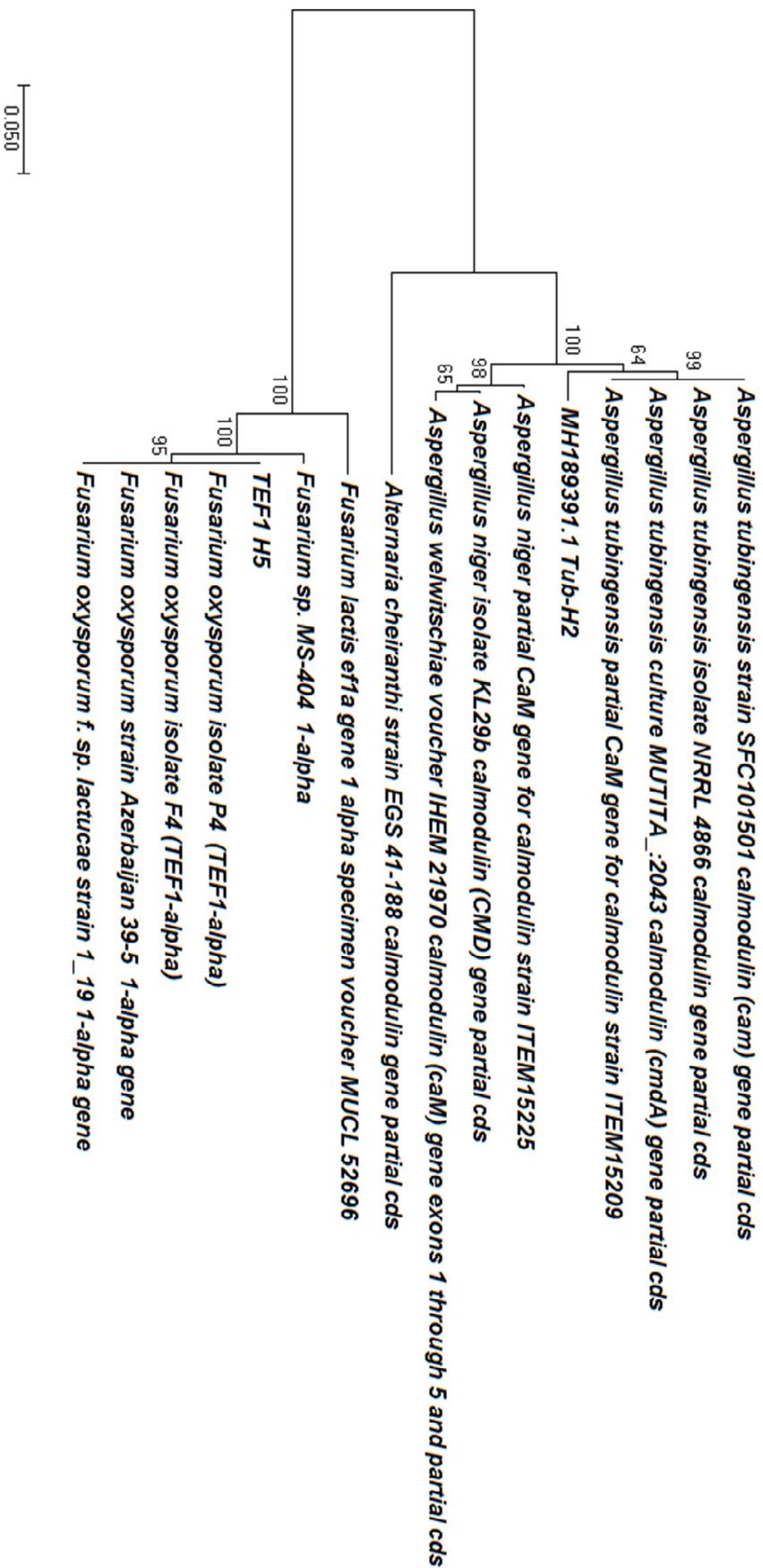


Figure 17 : Arbre phylogénétique selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) construit par le logiciel MEGA montrant la position phylogénétique des mycoendophytes résistants Tub-H2 et TEF1H5

L'arbre phylogénétique (Figure 17) présente deux grands clades séparés, regroupant deux groupes taxinomiques distincts considérés chacun un out groupe pour l'autre.

Pour le premier clade, *Alternaria cheranthi* est proposée par *Genbank* étant un out groupe en analysant les résultats de l'arbre de distance, le mycoendophyte H2 (Tub-H2) portant le numéro d'accèsion MH189391 est localisé dans le même clade que ceux des *Aspergillus tubingensis*, sachant que ces espèces sont apparentées.

Alors que, le mycoendophyte H5 (TEF1 H5) est placé sur la même branche des espèces apparentées proposées par *GenBank* avec 100% de similarité avec *Fusarium oxysporum*.

Discussion

Les champignons, et plus précisément les mycoendophytes, qui révèlent l'impact de l'antimoine et l'arsenic sur les populations microbiennes cultivables des sols, sont les moins abordés parmi les études menées dans ce domaine (Singh et al., 2015).

L'antimoine est le métalloïde le moins distribué dans l'environnement, contrairement à l'arsenic (Wang et al., 2010). En effet, l'attention sur ce polluant (Sb) est presque inexistante. Mais au cours des 30 dernières années, ce métalloïde est devenu un polluant très répandu. Selon Mubarak et al. (2015), la contamination des sols par Sb, due aux activités humaines, a considérablement augmenté et constitue une grave menace pour la santé humaine, pour d'autres organismes vivants et l'environnement. Le développement des biotechnologies d'élimination de Sb des sites contaminés est donc nécessaire.

Comme cela a été abordé précédemment, une étude antérieure a révélé des niveaux très élevés de Sb et As dans les sols entourant les déblais d'une ancienne mine d'antimoine (jusqu'à 81446 mg / kg) dans le Nord-Est algérien et plus précisément à Ain Babouche de la wilaya d'Oum El Bouaghi, entraînant des modifications de la végétation spontanée et l'adaptation de certaines plantes résistantes à ces fortes concentrations en métalloïdes comme *Hedysarum pallidum* Desf. et *Lygeum spartum* L. (Rached-Mosbah et al., 1988).

De ce fait, le présent travail se focalise sur la sélection et l'identification parmi les mycoendophytes isolés à partir des racines des plantes citées précédemment, des mycoendophytes résistants / tolérants à As et Sb, en déterminant leurs CMI.

D'après la littérature, les valeurs des CMI suggèrent le niveau de résistance / tolérance ou de sensibilité d'un microorganisme vis-à-vis l'élément considéré (Zafar et al., 2007). Selon Ahmad et al. (2006), Zafar et al. (2007) et Ansari et Malik (2010), les environnements contaminés par des métaux contiennent une flore fongique relativement plus résistante que les environnements non contaminés.

Cependant, il n'existe pas de critères stricts pour la désignation d'un champignon particulier comme résistant / tolérant ou sensible aux métaux. La concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un métal, suffisamment supérieure à la CMI₅₀ (Concentration nécessaire pour inhiber 50% des cellules viables d'un individu) peut être considérée comme tolérante ou résistante (Ahmed et al., 2011).

Par conséquent, les valeurs minimales des CMI désignent la toxicité élevée de métaux lourds et les valeurs maximales montrent la faible toxicité de ces métaux (Mishra et al., 2015).

Les CMI des deux métalloïdes As (III) et Sb (III) déterminées sur toutes les espèces mycoendophytes isolées dans cette étude (Figure 10) permettent de distinguer que certains isolats ont résisté à des doses élevées en As et Sb, de 30 mM et 500 mM respectivement, correspondant aux valeurs maximales déterminées par Benhamdi et al. (2014) dans la zone minière 62000 ± 4924 mg / kg Sb, 2300 ± 186 mg / kg As. Au-delà de ces concentrations, les CMI ont été définies, à savoir $CMI_{As} = 40mM$ soit ≈ 3000 ppm et $CMI_{Sb} = 525mM$ soit ≈ 64000 ppm. Ceci montre que les valeurs obtenues diffèrent de celles rapportées par d'autres auteurs comme Chan et al. (2014), qui ont trouvé que *Acidomyces acidophilus* avait toléré des doses supérieures à 20000 mg/L d'As et 300 mg/L de Sb, soit $20000 > CMI_{As} > 25000$ mg/L. Cette différence dans les concentrations critiques peut être expliquée par :

- ✓ la méthode de détermination de la CMI (en milieu liquide, en milieu solide en utilisant des disques ou par solutions sporales) ;
- ✓ le type de milieu (milieu riche ou pauvre) ;
- ✓ la nature du sel métallique ;
- ✓ la souche fongique testée et son origine.

Tous ces facteurs peuvent avoir une grande influence sur la toxicité des métaux et par conséquent sur les valeurs des CMI.

Il est très important de signaler que les travaux menés dans ce contexte sur l'antimoine sont très rares, voire inexistant c'est pourquoi, la comparaison des résultats des CMI obtenus n'a pas pu avoir lieu avec ceux de la littérature. En revanche, une étude menée au Laboratoire de Biologie et Environnement, a montré que *Serratia marcescens*, une bactérie endophyte, isolée à partir des racines d'*Hedysarum pallidum* Desf., a une CMI de 450 mM pour Sb (Kassa-Laouar et al., 2020), et une CMI de 175 mM d'As (données non publiées. Kassa-Laouar, 2020).

Selon les travaux de Khan et al. (2018) portant sur le pouvoir potentiel des champignons de tolérer l'arsenite (III), sur 18 souches fongiques, les isolats d'*Aspergillus fumigatus* et de *Fusarium oxysporum* étaient les plus résistants à l'arsenite, avec des CMI de 2000 et 2400 ppm respectivement. Ce qui concorde avec les résultats obtenus pour *Fusarium oxysporum* :

sa résistance est de 30 mM soit 2248 ppm et pour *Curvularia sp.* elle est de 5 mM soit 375 ppm As, contrairement à *Aspergillus fumigatus* qui s'est montré sensible, avec une : $5 > \text{CMI} > 10$ mM soit $375 > \text{CMI} > 750$ ppm. Toutefois *Penicillium sp. 4* s'est montré 7 fois plus tolérant que *Penicillium* isolé des sols d'Islamabad avec une CMI de 100 ppm.

Oladipo et al. (2016) ont rapporté qu'*Aspergillus tubingensis* isolé des sols contaminés par les métaux lourds au Nigeria, a résisté à 100, 1000, 400, 500 et 800 ppm de Cd, Cu, Pb, As et Fe respectivement. Or, dans la présente étude, cette même souche isolée des racines d'une plantes accumulatrice d'As et Sb a résisté jusqu'à 1500 ppm As et 61000 ppm Sb.

Selon Canovas et al. (2004), *Aspergillus sp P37* a la capacité de tolérer une très forte exposition à As (V) allant jusqu'à 200 mM soit ≈ 15000 ppm. Il a été également rapporté par Mukherjee et al. (2010) qu'*Aspergillus niger* est parvenu à résister jusqu'à 100 ppm As, et selon ce même auteur dans une autre étude *A. niger* a présenté une CMI 1200 ppm As (Mukherjee et al., 2013). Ceci suggère que ces champignons sont capables d'élaborer diverses stratégies de résistance à l'arsenic et à d'autres métaux lourds pour parvenir à croître sur de tels substrats fortement toxiques.

D'après Singh et al. (2015) les espèces d'*Aspergillus spp.* *Fusarium spp.* et *Trichoderma spp.* ont toléré des doses allant jusqu'à 10000 mg / L d'arsenite, à l'exception des espèces de *Penicillium spp.* qui n'ont pas pu pousser en présence de ces doses trop élevées.

Il est à remarquer, que chaque espèce possède son propre profil de résistance / tolérance, prenant l'exemple d'*Aspergillus fumigatus* isolé à partir des racines d'*H. pallidum*, qui paraît très sensible à As et résiste jusqu'à 30 mM Sb, alors que la même espèce isolée des racines de *L. spartum* a toléré 5 mM As et 50 mM Sb, sachant qu'*H. pallidum* concentrait dans ses racines jusqu'à 90 ppm Sb et 27 ppm As, alors que *L. spartum* concentrait 61 ppm Sb et 71 ppm As (Benhamdi et al., 2014) ; donc, comme il a été suggéré, l'origine de la souche a une influence sur son comportement cellulaire vis-à-vis de la toxicité de l'élément considéré, et pourtant l'antimoine et l'arsenic partagent des propriétés chimiques et toxicologiques similaires (Wang et al., 2010).

Le second volet consiste à identifier les deux mycoendophytes potentiellement résistants à l'antimoine et l'arsenic *via* l'approche moléculaire. En se basant sur les caractères cultureux et morphologiques des deux mycoendophytes, des marqueurs phylogénétiques ont été choisis afin de les identifier jusqu'à l'espèce.

La caractérisation phylogénétique d'un fragment génomique d'ADN ribosomique constitué de séquences (ITS) 1 et 2 et d'ADNr 5,8S en utilisant une combinaison d'amorces universelles à savoir ITS1F et ITS4, cette analyse n'a pas donné de résultats concluants pour la souche mycoendophyte H2. En comparant les séquences de cette région ITS avec les espèces apparentées au BLASTn, la souche H2 a montré une homologie de 99,83% avec une souche endophyte portant le numéro KT202946.1, ce qui conduit à confirmer que H2 est une vraie endophyte. Il est à signaler que cette même souche était homologue à *Aspergillus niger*, *A. sp.* et *A. tubingensis* avec le même score.

D'après la littérature, même si la région ITS fonctionne bien en tant que marqueur de code-barres fongique approprié, elle a fait l'objet d'un débat controversé. En effet la région ITS ne fonctionne pas bien chez certains genres très spécifiques tels que *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Trichoderma*, car ces taxons ont des lacunes de code-barres très étroites voir aucune dans leurs régions ITS (Raja et al., 2017), ce qui concorde avec les résultats obtenus de cette partie.

De ce fait, l'utilisation du marqueur ITS seul à des fins d'identification peut ne pas suffire dans certains clades de champignons, et l'utilisateur peut être amené à séquencer un ou plusieurs gènes codant pour une protéine à copie unique pour certains genres et / ou lignées de champignons, afin d'obtenir une identification plus précise au niveau de l'espèce (par exemple *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Trichoderma*) (O'Donnell et Cigelnik, 1997 ; Skouboe et al., 1999 ; Pryor et al., 2002 ; Schubert et al., 2007 ; Stielow et al., 2015).

L'un des avantages de l'utilisation de la région ITS comme marqueur standard est que la plupart des espèces fongiques ont été identifiées sur la base de cette région génomique (Benson et al., 2015). Schoch et ses collaborateurs. (2012) estiment que seules environ 50% des séquences ITS déposées dans des bases de données publiques sont annotées au niveau de l'espèce. De plus, Nilsson et ses collègues. (2006) ont estimé que plus de 10% de ces séquences ITS fongiques entièrement identifiées étaient mal annotées au niveau de l'espèce.

Pour les mycologues l'utilisation des marqueurs phylogénétiques (les gènes codants pour les protéines) tels que les Beta-tubuline (*tub2 / BenA*), les facteurs de traduction et d'élongation 1-alpha (*tef1*), la plus grande (*RPB1*) et la deuxième plus grande (*RPB2*) sous-unités de l'ARN polymérase et la calmodulin (*CaM*), offre un meilleur potentiel pour servir de

code à barres d'ADN secondaire, et une résolution supérieure à ITS (Rehner et Buckley, 2005).

En se basant sur la littérature, la souche étudiée (H5) résistante à l'arsenic a été affiliée à *Fusarium oxysporum* en amplifiant le marqueur moléculaire (*tef1*), en utilisant les amorces EF1-EF2. Les résultats obtenus corroborent les travaux de Geiser et al. (2004) et Maciá-Vicente et al. (2008) qui recommandent l'utilisation des facteurs de traduction et d'élongation 1-alpha (*tef1*) pour une meilleure identification des espèces *Fusarium spp.*

Les marqueurs phylogénétiques *RPB1*, *RPB2*, *tub2* / *BenA* et la calmodulin (*CaM*) sont utiles pour l'identification des espèces chez certaines lignées de champignons comme les Eurotiales, qui comprennent *Aspergillus* et *Penicillium* (Houbraken et al., 2011 ; Samson et al., 2014 ; Visagie et al., 2014).

Il existe une ambiguïté sur l'identité de la souche endophyte H2 affiliée au genre *Aspergillus*, sur la base de la littérature et les informations non convaincantes données par les ITS. Une discrimination de cette souche H2 a été menée par l'amplification du gène Calmodulin en utilisant des amorces spécifiques NIG1/NIG2 pour *Aspergillus niger* et TUB1/TUB2 pour *Aspergillus tubingensis* (Susca et al., 2007 ; Noonim et al., 2008). C'est ainsi que la séparation des amplicons sur le gel d'agarose a donné une première information sur l'identité de la souche en question. Ensuite, après le séquençage, les séquences obtenues ont été comparées avec celle de la banque de données (*GenBank*). La souche endophyte H2 résistante à l'antimoine a été identifiée comme étant *Aspergillus tubingensis*, portant le numéro d'accèsion **MH189391.1** avec 100% d'homologie avec les espèces apparentées.

Les deux espèces *Aspergillus tubingensis* et *Fusarium oxysporum* isolées pour **la première fois** des racines *Hedysarum pallidum* Desf., poussant sur les déblais de la mine d'antimoine et d'arsenic de la région d'Ain-Babouche, s'avèrent être de véritables endophytes, car elles ont été isolées à partir de nombreuses espèces végétales.

L'espèce *A. tubingensis* a été isolée des racines d'autres espèces végétales, *Pongamia pinnata* par Huang et al. (2010), des racines de *Tetragonia tetragonoides* par You et al. (2016), des tissus de mangroves par Bacal et Yu (2017) et également *A. tubingensis* (KJ476743.1) par Ma et al. (2015) des racines de *Lycium ruthenicum*.

Qayyum et al. (2016), ont isolé *A. tubingensis* (KM977888.1) à partir d'un sol industriel contaminé par des métaux lourds, et l'ont considéré comme étant un moyen précieux pouvant être utilisé de manière significative pour la biolixiviation ou la bioremédiation.

Fusarium oxysporum est un champignon phytopathogène bien connu qui affecte des centaines de cultures dans le monde entier. La plupart des études sur les champignons portent sur la capacité de *F. oxysporum* à provoquer le flétrissement chez un hôte particulier (Demers et al., 2014). Ce champignon peut également infecter et coloniser les plantes de manière asymptomatique en tant qu'endophyte. Il a aussi été isolé à partir des racines de plantes de mangroves : *Acanthus ilicifolius*, *Avicennia officinalis*, et *Rhizophora mucronata*, à Udyavara (Karnataka) sur la côte ouest de l'Inde par Ananda et Sridhar (2002), et par Mishra et al. (2014) à partir des racines de *Pennisetum glaucum*, et par González-Teuber et al. (2017) à partir des racines de *Chenopodium quinoa*. Il a été rapporté par de nombreuses études que *Fusarium oxysporum* tolérait de fortes teneurs en métaux lourds, comme évoqué précédemment.

Cette analyse microbiologique a permis de conclure qu'*H. pallidum* Desf. héberge dans ses racines plusieurs espèces mycoendophytes, parmi lesquelles un endophyte a pu tolérer 500 mM Sb, identifié comme étant *Aspergillus tubingensis*, par comparaison des séquences du gène Calmodulin avec les espèces apparentées du *GenBank*. Un autre endophyte a été affilié à *Fusarium oxysporum* résistant jusqu'à 30 mM As. Quant à *Lygeum spartum* L. qui héberge aussi une large diversité mycoendophyte dans son système racinaire, ces endophytes ont montré une certaine sensibilité à ces deux métalloïdes par rapport à ceux isolés d'*H. pallidum*.

Rappelons qu'*Hedysarum pallidum* Desf. et *Lygeum spartum* L. peuvent tolérer de fortes concentrations en métalloïdes dans le sol, soit par leur capacités à les accumuler dans les tissus comme c'est le cas pour *H. pallidum*, soit par leur tendance à les exclure de leurs tissus comme c'est le cas pour *L. spartum*, ce qui mène à confirmer l'existence de différents mécanismes de tolérance en fonction de la plante. La présence de la flore mycoendophyte chez *H. pallidum* aide l'hôte à tolérer et accumuler l'antimoine et l'arsenic. Par ailleurs plusieurs travaux dans ce contexte ont montré que l'interaction symbiotique entre les plantes et les endophytes notamment chez *Glomus deserticola* considéré comme endomycorhize, a un effet spécifique sur la tolérance et l'accumulation des métaux lourds dans leurs plantes-hôtes (Arias et al., 2010).

Chapitre 2 : Analyses toxicologiques

Dans cette partie, des analyses toxicologiques *in vitro* sur les deux mycoendophytes *Aspergillus tubingensis* et *Fusarium oxysporum* résistants à Sb et As respectivement, ont été effectuées au Laboratoire de Biochimie & Physiologie Moléculaire des Plantes (INRA Montpellier), afin de déterminer les mécanismes cellulaires de résistance de ces souches vis-à-vis de la toxicité du milieu.

Ce genre d'investigation est basé sur l'évaluation de la capacité de la bioaccumulation et de l'élimination de Sb et d'As par la biomasse active de ces mycoendophytes, en dosant les différentes teneurs de ces métalloïdes dans la biomasse fongique et le milieu, après culture. Mais malheureusement le dosage dans le milieu de culture n'a pas été mis en évidence en raison de la difficulté à analyser ces métalloïdes.

L'évaluation de l'impact de Sb et d'As sur la biomasse d'*Aspergillus tubingensis* et *Fusarium oxysporum* par leur poids sec, et la détermination de la capacité de cette biomasse fongique active des deux mycoendophytes à accumuler et à éliminer ces métalloïdes, ces analyses ont été effectuées par la méthode spectroscopique en utilisant le Agilent 4100 Microwave-Plasma Atomic-Emission-Spectroscopy (par extension MP-AES).

1. Impact de Sb et As sur la croissance des deux mycoendophytes

Les figures 18 et 19 montrent l'impact de la toxicité de Sb et d'As sur le poids sec des mycéliums d'*Aspergillus tubingensis* et *Fusarium oxysporum* cultivés sur bouillon Sabouraud à différentes concentrations de Sb (III) et As (III). Cette toxicité se manifeste de façon globale par une réduction très significative et négative du poids sec de la biomasse fongique des deux mycoendophytes en fonction de l'augmentation de la teneur en As et Sb dans le milieu de culture.

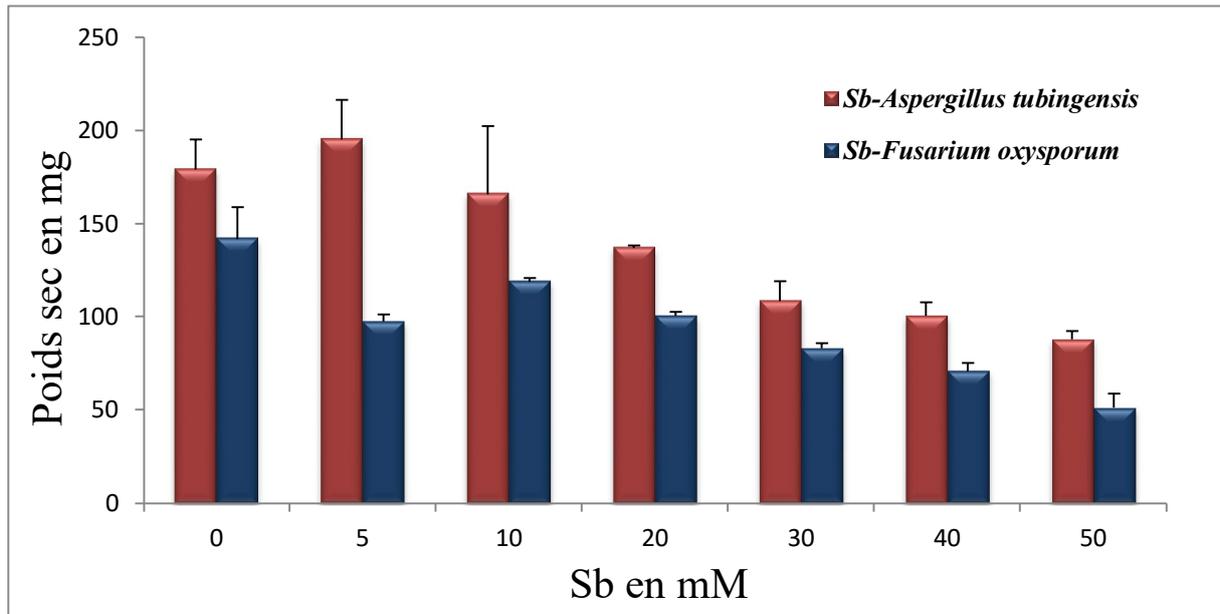


Figure 18 : Poids sec d'*A. tubingensis* et *F. oxysporum* après 96h d'incubation sur bouillon Sabouraud supplémenté par différentes concentrations de Sb (III)

Pour *A. tubingensis*, à 5 mM Sb une légère augmentation (9%) de la biomasse fongique par rapport à celle du témoin a été notée. Mais à partir de 10 mM Sb une diminution significative et progressive de la biomasse fongique a été constatée. A 50 mM Sb, malgré la toxicité du milieu, le mycoendophyte a gardé 49% de sa biomasse.

Quant à *Fusarium oxysporum*, à 5 mM Sb a perdu 31% de sa biomasse comparativement à celle du témoin. Au-delà de cette concentration une diminution progressive et significative du poids sec est observée, à 50 mM Sb, ce mycoendophyte a conservé uniquement 36% de sa biomasse par rapport au témoin.

La figure 19 montre l'effet des concentrations croissantes d'As sur la biomasse d'*Aspergillus tubingensis* et *Fusarium oxysporum* représentée par leur poids sec. Cela permet de constater que ce poids sec a subi une diminution significative avec l'augmentation des teneurs en As dans le milieu, tout en restant relativement important : 64% de la biomasse du témoin à 250 ppm pour *Fusarium oxysporum* et 45% à 30 ppm pour *Aspergillus tubingensis*. Ceci permet de déduire que l'impact de l'arsenic sur la biomasse fongique des mycoendophytes est plus élevé que celui de l'antimoine.

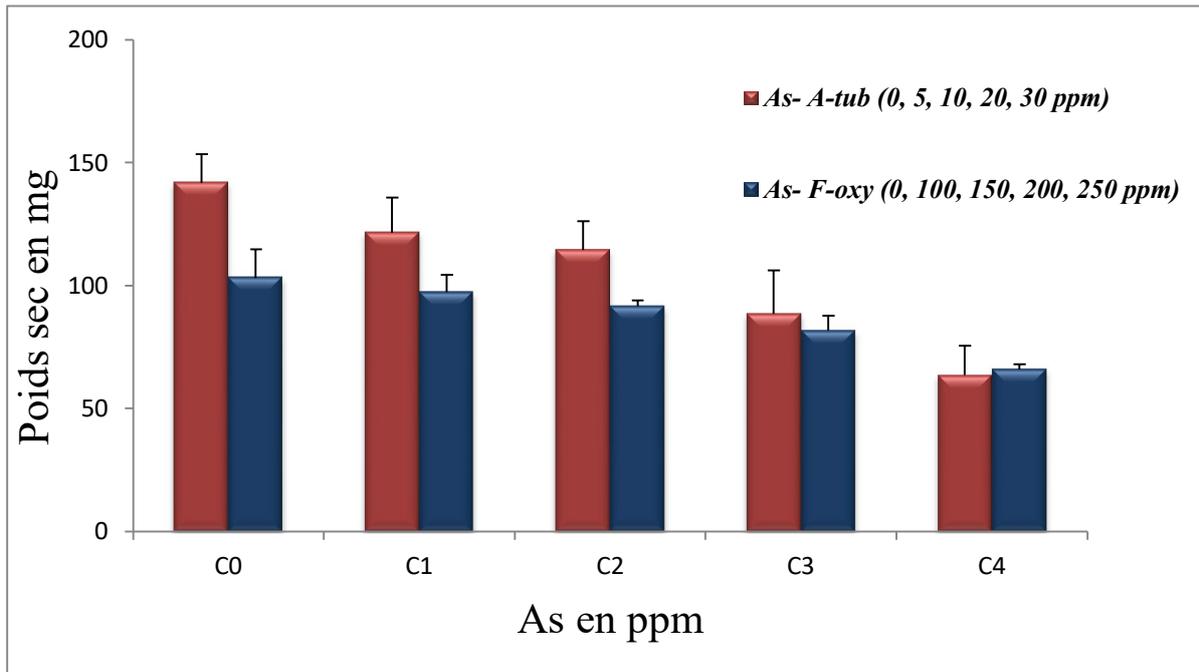


Figure 19 : Poids sec d'*A. tubingensis* et *F. oxysporum* après 96h d'incubation sur bouillon Sabouraud supplémenté par différentes concentrations d'As (III)

2. La bioaccumulation des métalloïdes par la biomasse active des mycoendophytes

Les figures ci-dessous (20, 21, 22, et 23) montrent que les mycoendophytes sont capables d'absorber / accumuler le Sb (III) et As (III) par voie intracellulaire. Généralement, la teneur prélevée de Sb et d'As augmente progressivement en fonction des concentrations de l'antimonite et de l'arsenite dans le milieu de culture, ce qui n'est pas le cas pour les cellules des témoins où l'absence des métalloïdes est relevée.

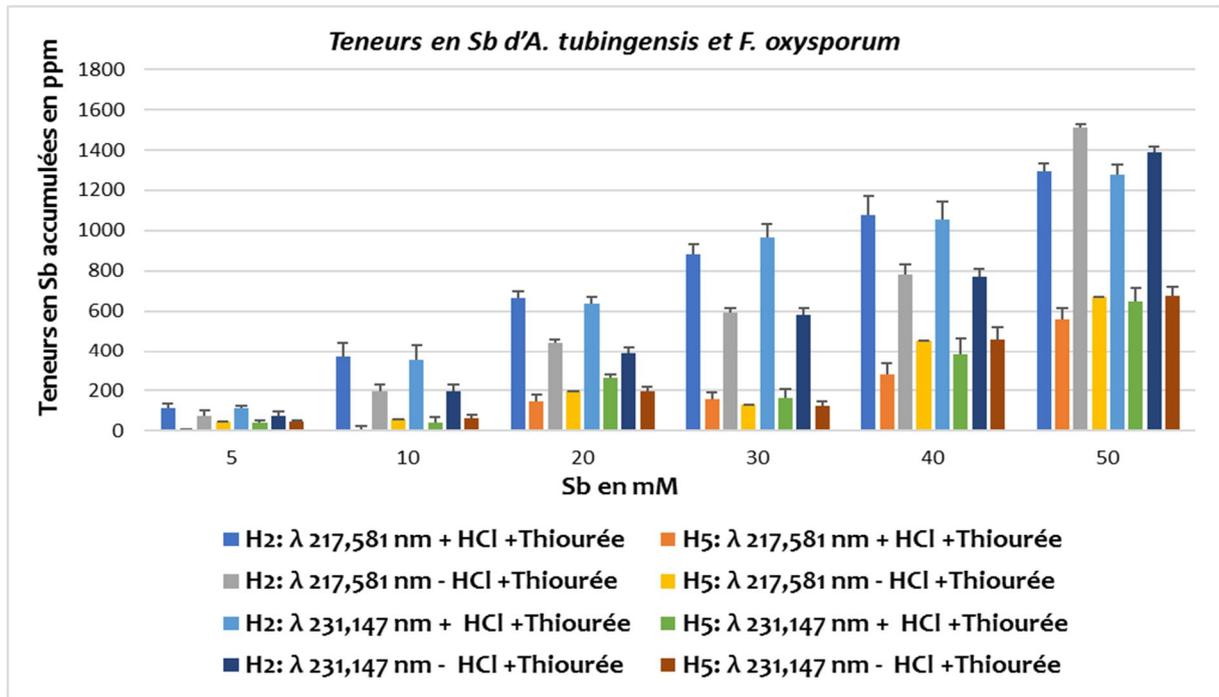


Figure 20 : Teneurs de Sb (III) accumulées par *A. tubingensis* et *F. oxysporum*

Il ressort des figures 20 et 21, que l'accumulation d'antimonite par la biomasse *Aspergillus tubingensis* est très significative par rapport à celle de *Fusarium oxysporum* pour les deux longueurs d'onde (217,581 nm et 231,147 nm) avec un pourcentage maximal d'élimination de 30,39% noté à 10 mM à Sb 217.581 nm et de 21% à 40 mM à la deuxième longueur d'onde, le prétraitement à l'HCl et la thiourée offre une meilleure détection de Sb pour *A. tubingensis* contrairement à *F. oxysporum*, où on note un maximal d'élimination de 11% à 50 mM.

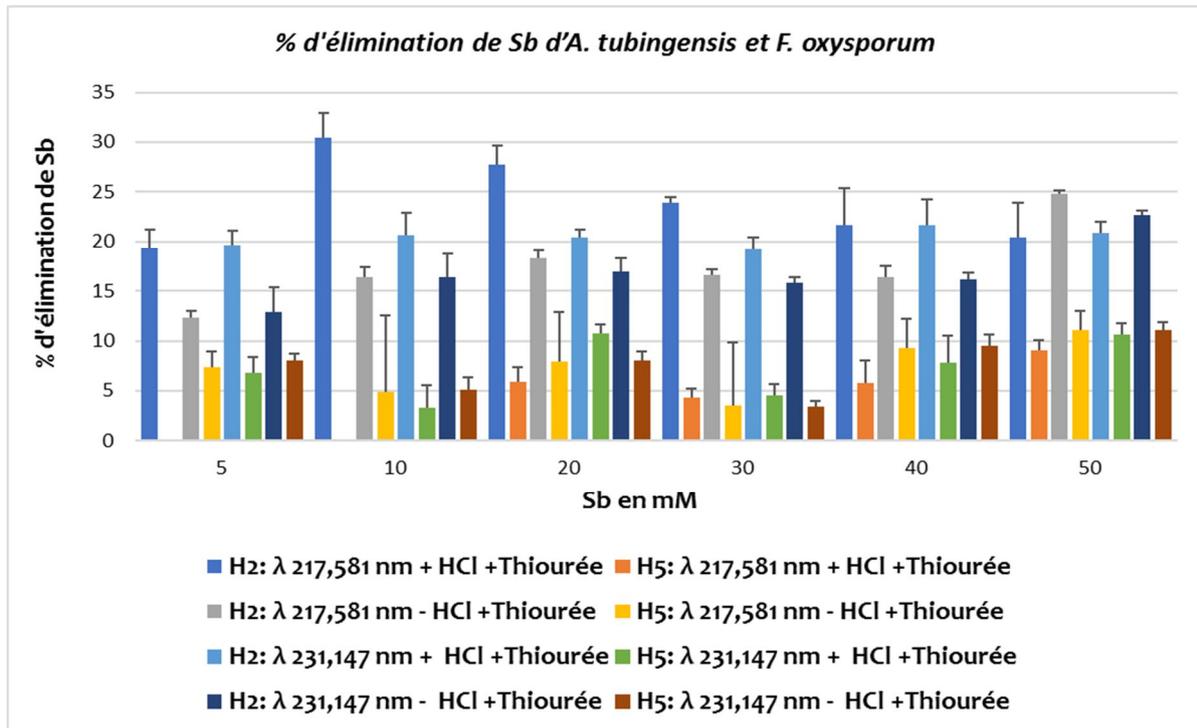


Figure 21 : Pourcentage d'élimination de Sb (III) par *A. tubingensis* et *F. oxysporum*

Les résultats des teneurs d'arsenite accumulées par la biomasse fongique des mycoendophytes, donnés dans la figure 22, ressortent que l'accumulation est très faible chez *Aspergillus tubingensis* et *Fusarium oxysporum*. Quant aux teneurs accumulées d'arsenite, elles sont presque nulles chez les deux endophytes tests, surtout lorsque le prétraitement à l'HCl et à la Thiourée est réalisé. Ainsi la limite de détection d'As est similaire pour les faibles teneurs comme pour les plus fortes.

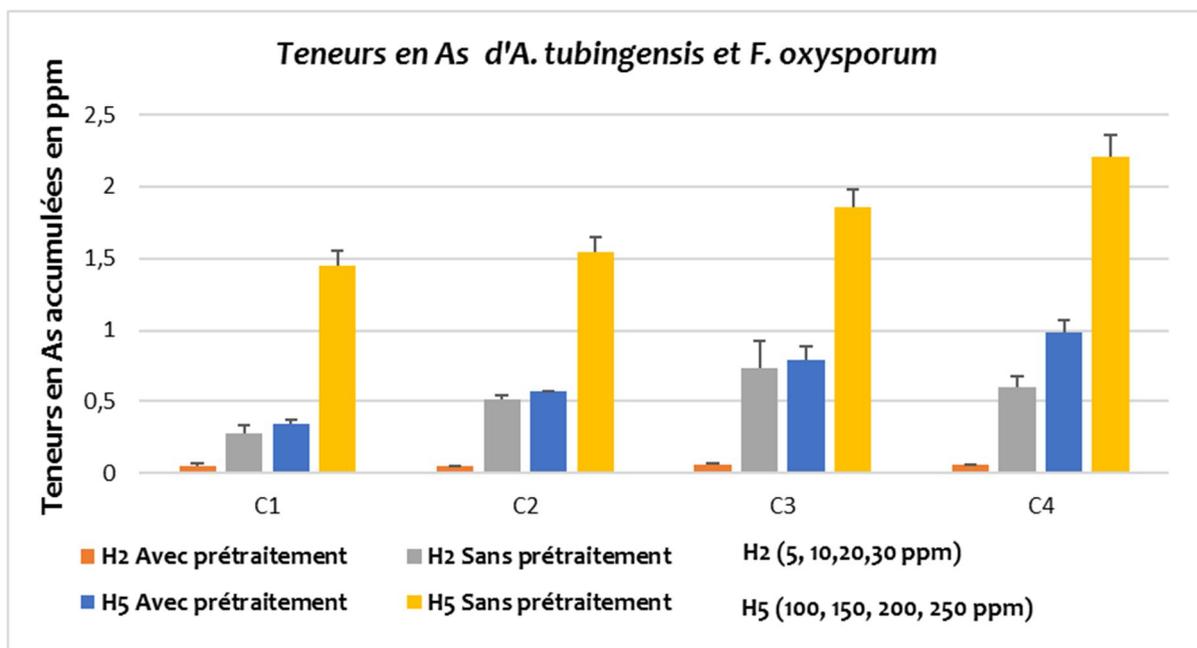


Figure 22 : Teneurs d'As (III) accumulées par *A. tubingensis* et *F. oxysporum*

L'accumulation de l'As pour les deux souches n'est pas significative en particulier pour *Fusarium oxysporum* par rapport aux doses d'arsenite dans le milieu de culture, son pourcentage d'élimination (figure 23) n'a pas dépassé 1,45%, sachant que ce mycoendophyte résiste jusqu'à 30 mM As soit 2250 ppm.

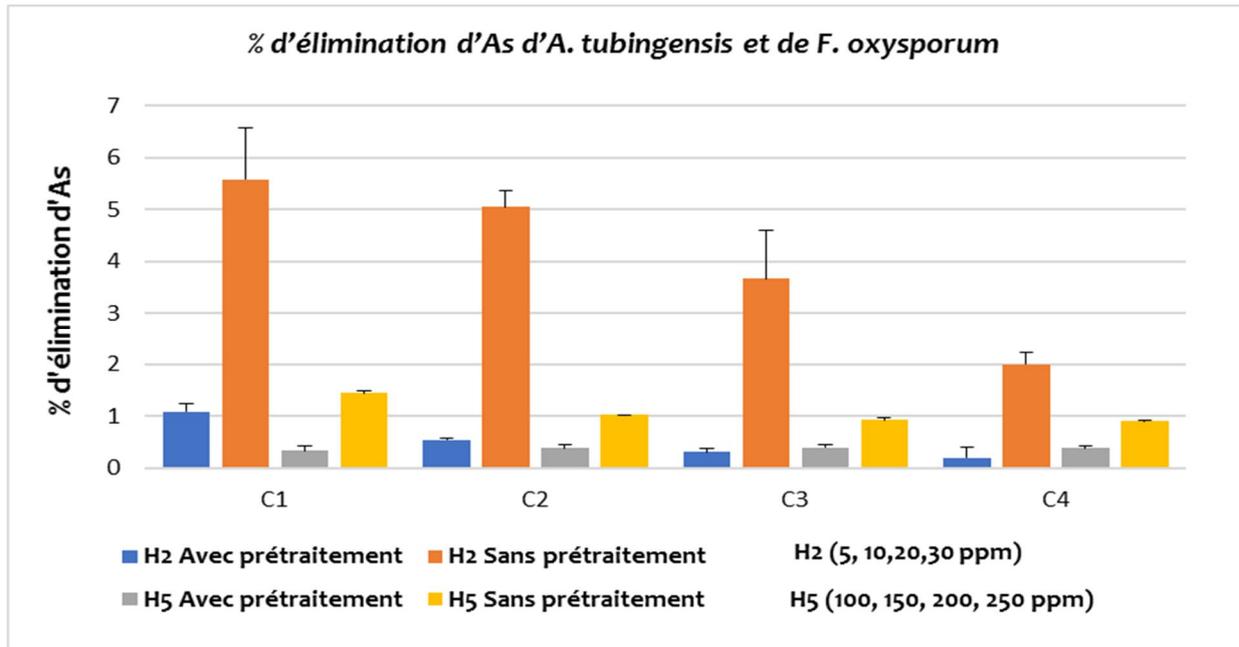


Figure 23 : Pourcentage d'élimination d'As (III) par *A. tubingensis* et *F. oxysporum*

Discussion

Les tests de toxicité *in vitro* ont montré qu'*Aspergillus tubingensis* est tolérant à des concentrations d'antimoine allant jusqu'à 500 mM Sb, soit 60880 mg kg⁻¹ et *Fusarium oxysporum* jusqu'à 30 mM As, soit 2248 mg kg⁻¹ ce qui correspond au niveau maximal de Sb déterminé dans la région minière (Benhamdi et al., 2014).

L'effet toxique de Sb et As sur ces deux endophytes est mis en évidence par la diminution significative de la biomasse en fonction de l'augmentation des concentrations de Sb et As dans le milieu de culture. Ceci est confirmé par la corrélation négative et très significative de la biomasse avec les doses des métalloïdes. Cette diminution peut s'expliquer par la modification des mécanismes physiologiques des souches tests en réponse à la toxicité du milieu. Ce qui est similaire à la réponse obtenue par *Aspergillus niger* en présence d'arsenite (Mukherjee et al., 2010), par *Aspergillus nidulans*, en présence de cadmium (Guelfi et al., 2003), et par *Aspergillus foetidus* en présence de plomb et de cadmium (Chakraborty et al., 2012 ; 2014).

D'après Niklińska et Chmiel (1997) les métaux lourds affectent la croissance, la morphologie ou le métabolisme des microorganismes des sols contaminés par les ETM.

En fait, selon Chakraborty et al. (2012, 2014) les quantités métalliques non létales induisent une perturbation de la perméabilité membranaire de la cellule fongique et, par conséquent, une perte importante d'éléments nutritifs essentiels à leur croissance.

De même, *A. tubingensis* et *F. oxysporum* étudiés ont conservé encore une biomasse significative de 49 et 36% du témoin, respectivement à 50 mM Sb, soit 6088 mg kg⁻¹. Ces mycoendophytes ont gardé 45 et 64% de leur biomasse à 30 et 250 ppm d'arsenite respectivement. Un tel résultat montre une résistance importante de ces espèces à la toxicité de l'antimonite et de l'arsenite. L'augmentation significative de la biomasse à 5 mM Sb observée par rapport au témoin, a montré que la croissance de la souche est stimulée par la présence de Sb. Or, la concentration de 5 mM, soit 609 mg kg⁻¹ est relativement élevée car les niveaux normaux de Sb dans les sols sont inférieurs à 8 mg kg⁻¹ (Clemente 2013).

Selon Benhamdi et al. (2014), la teneur maximale de l'antimoine (183 mg kg⁻¹), déterminée dans les racines de *H. pallidum* à partir desquelles *A. tubingensis* a été isolé,

s'avère également bien plus élevée que les teneurs normales des sols contaminés par le Sb. Un tel résultat montre que l'adaptation de ces souches fongiques à des niveaux excessifs de Sb dans l'environnement naturel n'a pas entravé leur développement à des concentrations seuils relativement élevées.

De même les travaux de Neijssel et al. (1990) ont révélé que l'antimoine à une concentration de 5 ppm stimule la production cellulaire de deux bactéries, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* mieux qu'à 1 ppm. Dans la présente étude, la présence d'ions potassium dans le tartrate trihydrate d'antimoine et de potassium utilisés comme source de Sb, semble influencer la croissance fongique. En effet les bactéries comme les champignons ont une concentration élevée de potassium dans leur cytoplasme et cytosols, et leur croissance peut être limitée par la forte disponibilité de potassium dans le milieu.

Au-delà d'un certain seuil (plus hautes concentrations utilisées pour les tests), l'antimonite et l'arsenite deviennent toxiques pour les souches en réduisant leur croissance, mais cette toxicité reste peu prononcée car ces souches conservent encore une biomasse importante. Par ailleurs les résultats obtenus dans la présente analyse sont corroborés par les travaux de Guelfi et al. (2003) pour le cadmium, Mukherjee et al. (2010) pour l'arsenic et Chakraborty et al. (2012) pour le plomb.

La pollution de l'environnement par les métaux lourds et les métalloïdes, due aux activités industrielles et au développement technologique, constitue une menace significative pour l'environnement et la santé publique en raison de leur toxicité, leur non-biodégradabilité et leur bioaccumulation dans les chaînes alimentaires terrestres et aquatiques (Pérez-Marín et al., 2008).

La plupart des méthodes physico-chimiques utilisées pour éliminer ces polluants sont coûteuses, inefficaces et demandent beaucoup de travail. C'est pourquoi, l'attention s'est portée ces dernières années sur le potentiel biotechnologique des microorganismes pour éliminer les métaux, directement, des milieux pollués, vu que la présence des microorganismes favorise la croissance des plantes dans les sols contaminés par des métaux (Deng et al., 2012).

Étant donné que les plantes accumulatrices de métaux peuvent supporter des concentrations élevées de certains métaux lourds, elles peuvent héberger divers endophytes présentant un potentiel de bioremédiation (Xiao et al., 2010).

Par conséquent, l'objectif de cette étude était d'évaluer les applications potentielles des mycoendophytes *Aspergillus tubingensis* et *Fusarium oxysporum* isolés des racines d'*Hedysarum pallidum* Desf. accumulatrice de métalloïdes, pour la bioremédiation de l'antimoine et l'arsenic des environnements contaminés.

Les résultats des analyses toxicologiques par MP-AES suggèrent que les deux mycoendophytes tests accumulent de manière significative des doses importantes de Sb dans leur biomasse totale, car elles tolèrent, accumulent et éliminent des quantités importantes d'antimonite du milieu de culture. De même, une augmentation très significative et positive de la teneur intracellulaire de Sb, avec l'augmentation des doses de Sb dans le milieu de culture, est observée pour *A. tubingensis* et *F. oxysporum* pour les deux longueurs d'ondes, que ce soit avec prétraitement à l'HCl et la Thiourée ou sans.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux de plusieurs études sur les métaux lourds : Mukherjee et al. (2010) ; Chakraborty et al. (2012 ; 2014). Par contre pour les teneurs d'arsenite accumulées, l'augmentation n'est pas significative avec l'augmentation des doses d'As dans le milieu de culture, pour les deux souches tests. Ces résultats sont en concordance avec l'étude de Cernansky et al. (2009), mettant en évidence, d'une part que la biomasse d'*Aspergillus niger* accumulait de 0,1 ppm à 4,24 ppm et de 0,3 ppm à 17,06 ppm de l'arsenic trivalent et d'autre part que la capacité de cette souche à la biovolatilisation d'As (III) était de 13 et 17% pour 4,24 ppm et 17,06 ppm respectivement.

Cependant Mukherjee et al. (2010) a trouvé que la teneur intracellulaire en As augmente progressivement avec l'accroissement d'arsenite dans le milieu de culture et l'accumulation maximale est déterminée aux alentours de 8 mg kg⁻¹ à 75 mg L⁻¹.

La capacité de résistance aux métaux lourds est définie par la capacité d'un micro-organisme à réagir et à mettre en œuvre des mécanismes pour les tolérer. Les mécanismes de résistance à la survie des champignons incluent la biosorption cellulaire, la précipitation extracellulaire, la complexation, la compartimentation intracellulaire et la séquestration des métaux lourds (Gadd, 1994 ; Zafar et al., 2007). La biosorption des métaux lourds repose sur

des espèces ioniques associées aux polysaccharides extracellulaires ou à la surface des cellules, aux protéines et aux chitines (Du et al., 2009).

Il ressort de la présente expérience, que la quantité de biomasse des deux souches tests en présence d'arsenite, est relativement constante, donc les sites actifs sont limités. Lorsque la majorité des sites actifs sont occupés par des ions métalliques, la concentration d'As n'augmente pas de manière significative (Zeng et al., 2013).

Les travaux de Mukherjee et al. (2013) montrent qu'*Aspergillus flavus* est capable d'éliminer plus d'arsenic qu'*Aspergillus niger*. Ces deux souches ont révélé leur efficacité d'élimination maximale (70% à 76%) lorsqu'elles sont cultivées à une concentration de 100 ppm d'arsenic.

Selon, Bhar et al. (2003) *Aspergillus*, *Rhizopus* et *Penicillium* éliminent l'As (III) et l'As (V) et ils ont trouvé que *Penicillium* avait une efficacité d'élimination maximale pour les deux formes d'As, qui augmente avec le temps d'incubation (du 3^{ème} au 6^{ème} jour) et une saturation allant au 9^{ème} jour.

Ridvan (2003) a également travaillé sur *Penicillium purpurogenum* pour montrer la capacité de bioaccumulation des métaux lourds Pb, Cd, As et Hg. Il a observé une accumulation selon l'ordre : Pb (II) > Cd (II) > Hg (II) > As (III).

Les résultats obtenus pour l'arsenic sont en accord avec les conclusions d'un groupe de chercheurs sur le potentiel d'élimination de l'arsenic par *Aspergillus candidus* et par *A. flavus* (Vala, 2010 ; Maheswari et Murugesan, 2011). De même, Srivastava et al. (2011) ont identifié près de dix espèces tolérantes jusqu'à 5000 mg / L d'arsenic et ils ont signalé que le potentiel d'élimination de l'arsenic par *Trichoderma* est de 59 % et celui d'*Aspergillus sp* est de 85%, ces deux espèces sont isolées de sites contaminés par l'arsenic au Bengale occidental.

Pečiulytė et Dirginčiūtė-Volodkienė (2012), Gupta et al. (2015) et Ayangbenro et Babalola (2017) ont rapporté que les champignons ayant la plus grande résistance aux métaux lourds ne les accumulent pas dans leur biomasse mais les lient à la surface de leurs parois cellulaires, ce qui empêche leur pénétration.

La littérature montre que les champignons sont des accumulateurs potentiels de métaux grâce à leurs parois cellulaires riches en chitine, en ions inorganiques, en

polysaccharides, en protéines et en lipides contenant des groupes fonctionnels potentiellement complexant (Trevors et al., 1986 ; Gaad, 1993, Tkaczuk et al., 2019).

La première barrière comprend des substances excrétées telles que des acides organiques et / ou des protéines capables d'immobiliser les métaux lourds. La deuxième barrière comprend la liaison (non spécifique) de métaux lourds par la paroi cellulaire et de mélanines situées dans la paroi cellulaire. Les métaux lourds toxiques qui ne peuvent pas être retenus à l'extérieur de la cellule doivent être détoxifiés à l'intérieur de la cellule (Mishra et Malik, 2013 ; Ayangbenro et Babalola, 2017). Ceci concorde avec les résultats de *Fusarium oxysporum* obtenus dans cette analyse.

Enfin, compte tenu des résultats obtenus et comparativement avec ceux des nombreux auteurs sur le mécanisme cellulaire de *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus tubingensis*, ne sont pas concluants car le dosage des métalloïdes dans les milieux de culture résiduels n'a pas été effectué, alors qu'il donne des informations complémentaires sur la capacité de biovolatilisation.

A cet égard des analyses biochimiques ont été menées, pour mieux cerner les mécanismes de résistance et/ ou tolérance contre la toxicité des polluants dans les environnements.

Chapitre 3 : Analyses biochimiques

Les stress environnementaux tels que l'exposition aux métaux lourds favorisent la formation d'espèces réactives d'oxygène (ROS), telles que les radicaux hydroxyles (OH^\bullet), les radicaux superoxydes (O_2^\bullet) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui pourraient induire ou exacerber un stress oxydatif intracellulaire. Ces ROS peuvent entraîner une oxydation non spécifique des protéines et des lipides membranaires ou endommager l'ADN (Lazarova et al., 2014). Les mécanismes de défense qui neutralisent l'impact des ROS, notamment les systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, existent dans toutes les cellules aérobies. Les interactions entre les éléments métalliques, le niveau du stress oxydatif et la défense antioxydante jouent un rôle important dans la réponse écotoxicologique des microorganismes dans des environnements pollués (Kamiński et al., 2007).

Afin d'évaluer le potentiel des défenses antioxydantes en réponse au stress généré par la toxicité de l'antimoine et de l'arsenic, la présente expérimentation se focalise à analyser l'effet de l'augmentation des concentrations en ions Sb et As sur les biomarqueurs antioxydants enzymatiques et non enzymatiques d'*Aspergillus tubingensis* et *Fusarium oxysporum* afin d'évaluer si ces enzymes antioxydantes ont un rôle dans la tolérance des mycoendophytes aux métalloïdes, et la possibilité de les utiliser comme agents potentiels de bioremédiation.

1. Effet de Sb et d'As sur le pH du milieu de culture

Après 96h de croissance d'*Aspergillus tubingensis* et de *Fusarium oxysporum*, des variations de pH sont observées (Tableau 9). Pour les groupes témoins, le pH du milieu a diminué de 6,39 à $3,80 \pm 0,011$ pour le premier groupe et de 6,39 à $5,43 \pm 0,026$ pour le second. En augmentant les doses de Sb (entre 5 et 30 mM), le pH des milieux diminue graduellement pour le groupe d'*A.tubingensis*. Or, à 20 mM Sb le pH baisse à $4,02 \pm 0,03$.

Pour le groupe *F. oxysporum*, la diminution du pH n'est pas significative, même avec l'augmentation des doses de Sb dans le milieu, d'ailleurs que ce soit à 5 mM ou 30 mM Sb, le pH diminue de 6,34 à $4,97 \pm 0,030$.

Tableau 9 : Variations du pH du bouillon Sabouraud tamponné additionné de Sb après la croissance fongique

Concentration de Sb (mM)	<i>Aspergillus tubingensis</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>	
	pH initial du milieu de culture	pH final du milieu résiduel	pH initial du milieu de culture	pH final du milieu résiduel
0	6,39 ± 0,036	3,80 ± 0,011 b c	6,39 ± 0,025	5,43 ± 0,026 b
5	6,36 ± 0,035	3,81 ± 0,015 c	6,34 ± 0,017	5,07 ± 0,025 a
10	6,37 ± 0,100	3,73 ± 0,026 a b	6,32 ± 0,020	4,95 ± 0,015 a
20	6,38 ± 0,056	4,02 ± 0,03 d	6,35 ± 0,020	5,07 ± 0,020 a
30	6,38 ± 0,076	3,68 ± 0,026 a	6,43 ± 0,026	4,97 ± 0,030 a

Les variations du pH des milieux après 96 h d'incubation (Tableau 10), montrent que le pH du groupe témoin d'*A. tubingensis* a d'avantage diminué (6,21 à 4,48 ± 0,083) que celui du groupe témoin de *F. oxysporum* (6,31 à 5,43 ± 0,026).

Pour le lot *A. tubingensis*, l'augmentation des doses d'arsenic dans le milieu a induit une diminution progressive et significative du pH des milieux de culture. Ainsi à 20 mM As le pH initial était 6,25 est devenu égal à 3,99 ± 0,047 à la fin de la culture. Alors que pour le lot *F. oxysporum*, la baisse du pH est faible, excepté à 15 mM où le pH a atteint 4,97 ± 0,020.

Tableau 10 : Variations du pH du bouillon Sabouraud tamponné additionné d'As après la croissance fongique

Concentration d'As (mM)	<i>Aspergillus tubingensis</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>	
	pH initial du milieu de culture	pH final du milieu résiduel	pH initial du milieu de culture	pH final du milieu résiduel
0	6,21 ± 0,010	4,48 ± 0,083 c	6,31 ± 0,025	5,43 ± 0,026 a
5	6,22 ± 0,015	3,56 ± 0,020 a	6,37 ± 0,06	5,49 ± 0,080 c
10	6,25 ± 0,015	3,65 ± 0,025 a	6,33 ± 0,025	5,05 ± 0,051 b c
15	6,23 ± 0,010	3,68 ± 0,015 a	6,36 ± 0,017	4,97 ± 0,020 c
20	6,25 ± 0,020	3,99 ± 0,047 b	6,34 ± 0,020	5,14 ± 0,026 b

2. Effet de la toxicité de Sb et As sur la croissance des mycoendophytes

La représentation graphique (Figure 24) de l'effet des concentrations croissantes de Sb et d'As sur la biomasse, représentées par le poids sec d'*Aspergillus tubingensis* et *Fusarium oxysporum*, permet de constater que ces espèces subissent une diminution significative de leurs poids secs avec l'accroissement des doses de Sb et As dans le milieu.

Pour *A. tubingensis*, une diminution très significative du poids sec est notée à 10, 20 et 30 mM de Sb, tout en restant relativement importante (61% de la biomasse du témoin à 30 mM). Mais à 5 mM de Sb, une augmentation significative de la biomasse fongique, de 25%,

est constatée par rapport au témoin. Or, pour *A. tubingensis* une diminution hautement significative et négative du poids sec avec l'augmentation d'As dans le milieu est notée (Figure 24 et Tableau 12), qui en présence de 20 mM As a gardé uniquement 36% de sa biomasse par rapport au témoin.

Quant à *Fusarium oxysporum* en présence des doses croissantes de Sb et As, il subit une baisse de croissance se traduisant par la baisse de son poids sec. Cette baisse de poids sec présente une corrélation négative et hautement significative avec les concentrations de Sb et As (Tableaux 13, 14), où *F. oxysporum* a gardé tout de même respectivement 66% et 67% de sa biomasse à 30 mM Sb et 20 mM As.

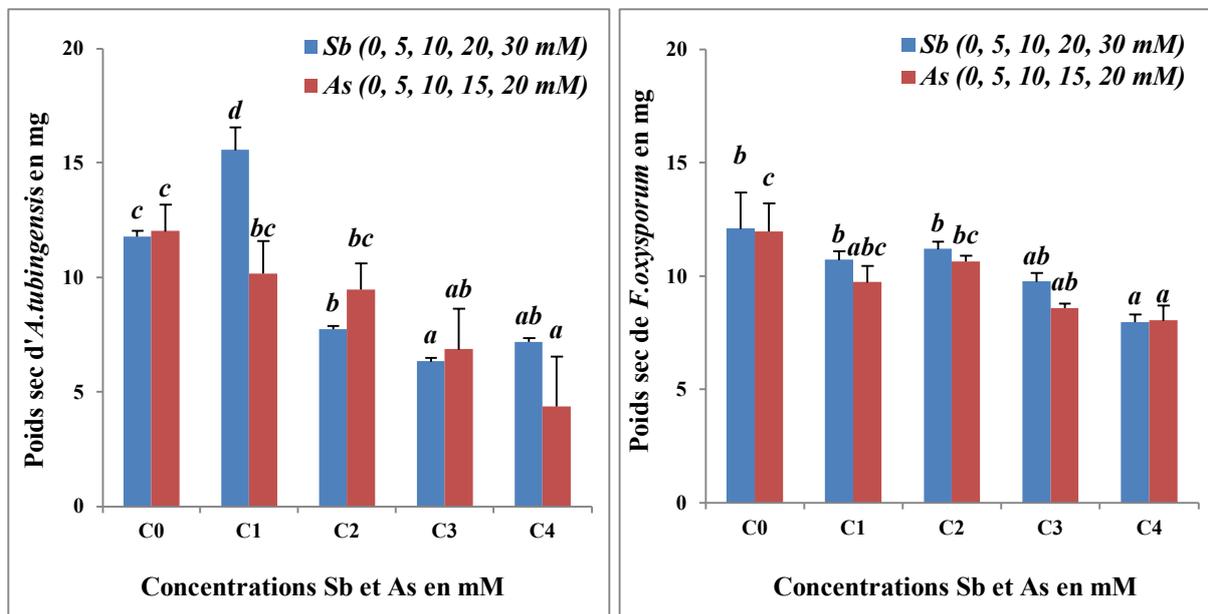


Figure 24 : Poids secs des mycéliums d'*A. tubingensis* et de *F. oxysporum*

Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM (n = 3). Les lettres (a, b, c, d) représentent les différences statistiques entre les poids secs en fonction des concentrations croissantes en Sb et As (en utilisant ANOVA suivie par le test HSD de Tukey, $p < 0,05$).

Tableau 11 : Matrice de corrélation de *Pearson* entre toutes les variables analysées et les concentrations de Sb dans le milieu de culture pour *A. tubingensis*

Variables	Poids sec	H ₂ O ₂	MDA	Proline	CAT	SOD	POD	APX
Sb mM	-0,7106**	0,8682***	0,8415***	0,9338***	0,6885**	0,9192***	-0,6564**	-0,7447**
Poids sec	1	-0,5353*	-0,7058**	-0,4358	-0,0960	-0,4979	0,9273***	0,9108***
H₂O₂		1	0,6108*	0,8586***	0,6054*	0,8836***	-0,4244	-0,4560
MDA			1	0,7039**	0,3723	0,7109**	-0,7120**	-0,8004***
Proline				1	0,8498***	0,9261***	-0,3955	-0,5108
CAT					1	0,7550**	-0,1519	-0,2772
SOD						1	-0,4514	-0,5247*
POD							1	0,9321***

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$

* $p < 0,05$; ** $p < 10^{-2}$, *** $p < 10^{-3}$ ($n = 15$)

3. Effet de Sb et d'As sur les biomarqueurs non-enzymatiques

3.1 Teneur intracellulaire en H₂O₂

Les contenus en H₂O₂ intracellulaire d'*A. tubingensis* et *F. oxysporum* en fonction des concentrations de Sb et As dans le milieu de culture Sabouraud, pour une durée de 96 h, sont représentés dans la figure 25.

Pour *A. tubingensis*, les teneurs en H₂O₂ intracellulaires (Figure 25) ne présentent pas d'augmentation significative à 5, 10 et 20 mM Sb. À 5 mM Sb, elles sont légèrement inférieures à celles du contrôle, alors qu'à 10 et 20 mM Sb, les augmentations sont de 174% et 197% respectivement par rapport au témoin. À 30 mM de Sb, les teneurs en H₂O₂ intracellulaire sont significativement supérieures à celles du témoin, qu'elles dépassent de 631%, en présentant une corrélation positive et hautement significative avec les concentrations de Sb dans le milieu, mais négative et significative avec le poids sec de la souche (Tableau 11).

L'augmentation de la teneur intracellulaire en H₂O₂ est corrélée de façon positive et hautement significative, avec l'accroissement de la toxicité de l'arsenite dans le milieu pour *A. tubingensis*. Ainsi, la concentration du peroxyde d'hydrogène à 20 mM As devient 4 fois plus importante que celle du témoin. De plus, ces concentrations en H₂O₂ sont négativement et très significativement corrélées avec le poids sec de cette souche (Tableau 12).

Pour *F. oxysporum*, les contenus intracellulaires en H₂O₂ en présence de Sb et As dans le milieu de culture, augmentent de façon positive et hautement significative avec la progression des doses de ces métalloïdes dans le milieu. Or pour les trois premières

concentrations en Sb et As, l'augmentation du H₂O₂ n'est pas significative, car les contenus en H₂O₂ sont de 146% et 154% respectivement à 10 mM Sb et 10 mM As par rapport au témoin.

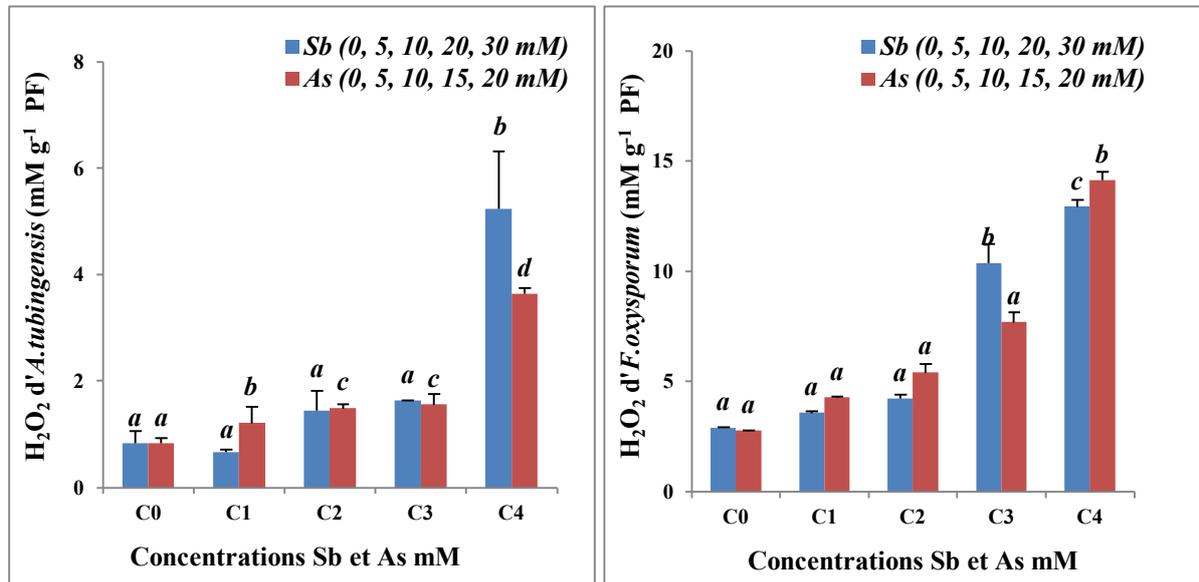


Figure 25 : Teneur intracellulaire en H₂O₂ chez *A. tubingensis* et *F. oxysporum*

Les valeurs des concentrations en H₂O₂ représentent la moyenne ± SEM (n = 3). Les lettres (a, b, c, d) représentent les différences statistiques entre les concentrations (en utilisant ANOVA suivie par le test HSD de Tukey, p < 0,05).

En effet, les contenus en H₂O₂ sont de 4 à 5 fois plus importants que ceux du témoin pour 30 mM Sb et 20 mM As respectivement. Pour cette même souche, les concentrations en H₂O₂ libérées en présence de Sb, présentent une corrélation négative et hautement significative avec le poids sec, et une corrélation négative et très significative avec le poids sec en présence d'As dans le milieu de culture (Tableaux 13, 14).

3.2 Peroxydation lipidique

Les teneurs en MDA, en fonction des concentrations du Sb et As dans le milieu de culture, sont représentées dans la figure 26, où, après 96 h de croissance d'*Aspergillus tubingensis* et de *Fusarium oxysporum*, une augmentation significative est notée, des teneurs en MDA avec l'augmentation de la concentration en Sb et As dans le milieu de culture.

La teneur en MDA d'*A. tubingensis* s'élève significativement à 5 et 10 mM Sb par rapport au contrôle. A 5 mM Sb, la teneur en MDA dépasse celle du contrôle de 24%, alors qu'à 10 mM Sb, elle la dépasse de 44%. De 10 à 30 mM Sb, les teneurs en MDA sont restées significativement invariables. Ces teneurs montrent des corrélations positives et hautement

significatives avec les concentrations de Sb dans le milieu, positives et significatives avec le H₂O₂, mais négatives et très significatives avec le poids sec de la souche (Tableau 11).

En présence de doses croissantes d'As pour *A. tubingensis*, une augmentation significative est constatée, où les teneurs en MDA dépassent celles du contrôle de 50 % et 87% à 10 et 15 mM As respectivement. Alors qu'à 20 mM As le MDA est réduit de 40% par rapport à 15 mM As.

Les teneurs en MDA sont corrélées de façon positive et très significative avec les teneurs en peroxyde d'hydrogène. Par contre, aucune corrélation n'est observée entre le MDA et les doses d'As, et le poids sec de la souche *A. tubingensis* (Tableau 12). En revanche, si la concentration d'As 20 mM ($n=12$) est soustraite, la teneur en MDA devient positivement et hautement significative, corrélée avec les doses d'As et les contenus en H₂O₂, mais négativement et hautement significative, corrélée avec le poids sec (Tableau 15 en annexe 4).

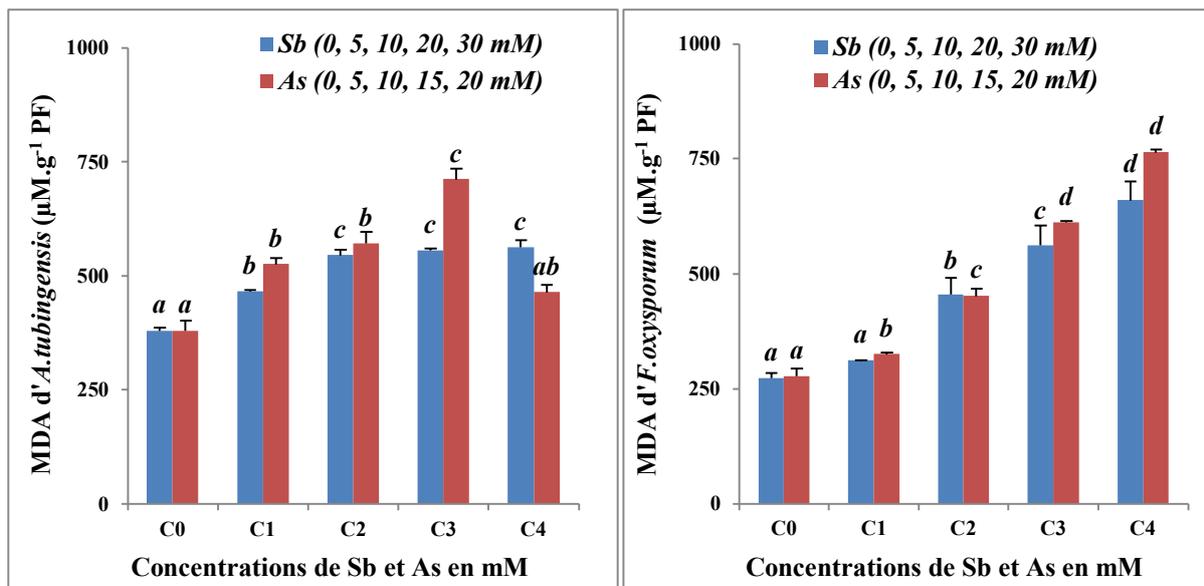


Figure 26 : Contenu en MDA chez *A. tubingensis* et *F. oxysporum*

Les concentrations du MDA de *F. oxysporum* présentent une augmentation hautement significative et positive en fonction de l'augmentation des concentrations de Sb et As dans le milieu de culture (Tableaux 13, 14). Globalement, les concentrations en MDA de cette souche suivent la même variation pour les deux métalloïdes, tout en notant que le MDA libéré en présence d'arsenic est légèrement plus important que celui du Sb. Cette souche présente des corrélations positives et hautement significatives entre le MDA, les teneurs en métalloïdes, et les teneurs en H₂O₂, mais une corrélation négative avec le poids sec.

Tableau 12 : Matrice de corrélation de *Pearson* entre toutes les variables analysées et les concentrations d'As dans le milieu de culture pour *A. tubingensis*

Variables	Poids sec	H ₂ O ₂	MDA	Proline	CAT	SOD	POD	APX
As mM	-0,8958***	0,8589***	0,4530	0,7963***	0,8045***	0,5773*	0,6138*	-0,5895*
Poids sec	1	-0,7559**	-0,3504	-0,7785***	-0,7002**	-0,5172*	-0,5367*	0,4242
H ₂ O ₂		1	0,6251**	0,5606*	0,8504***	0,6464**	0,7594**	-0,6918**
MDA			1	-0,1530	0,8237***	0,1645	0,9034***	-0,8598***
Proline				1	0,3749	0,5958*	0,1258	-0,0481
CAT					1	0,5455*	0,9464***	-0,7113**
SOD						1	0,5089	-0,2539
POD							1	-0,7338**

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$

* $p < 0,05$; ** $p < 10^{-2}$, *** $p < 10^{-3}$ ($n = 15$)

3.3 Contenu intracellulaire en proline

La figure 27 présente les teneurs en proline intracellulaire d'*A. tubingensis* et de *F. oxysporum*, après 96 h de croissance dans le milieu Sabouraud supplémenté avec des doses croissantes en Sb et As. Elle fait ressortir que la teneur en proline d'*A. tubingensis* augmente significativement à 5 mM de Sb, et qu'elle est de 69% plus élevée que celle du témoin et significativement très proche du contenu obtenu à 20 mM de Sb, tandis qu'à 10 mM Sb elle diminue également et se rapproche du témoin (28% de plus). Les taux de proline augmentent de manière significative à 20 et 30 mM Sb, dépassant ceux du témoin de 97,50% et 177% respectivement.

En général, le diagramme montre une augmentation progressive des taux de proline avec l'augmentation de Sb, sauf à 5 mM. Par conséquent, ils sont corrélés de manière positive et très significative à hautement significative avec, les doses d'antimonite, les teneurs en H₂O₂ et en MDA, mais non corrélés avec le poids sec (Tableau 11).

De plus, la proline intracellulaire de cette souche augmente avec l'accroissement de la teneur en As dans le milieu. A 5 mM As, l'augmentation de la proline est de 17% par rapport au témoin. De plus, à 10 et 15 mM As la teneur en proline s'élève à 29% pour les deux concentrations. Tandis qu'à 20 mM As, la proline atteint une teneur trois fois plus élevée que celle du témoin. Le tableau 12 de la matrice de *Pearson* révèle des corrélations positives et significatives à hautement significatives de la proline avec l'arsenite, le H₂O₂ respectivement et négativement avec le poids sec, mais aucune corrélation avec le MDA.

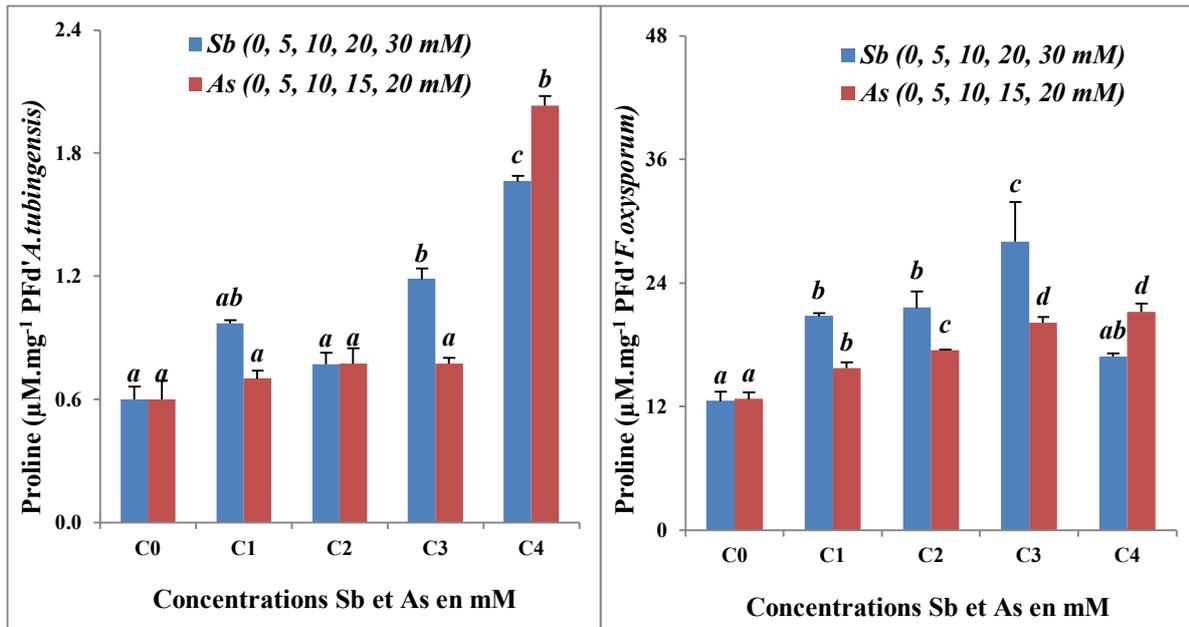


Figure 27 : Teneur intracellulaire en proline chez *A. tubingenensis* et *F. oxysporum*

Pour *F. oxysporum*, une augmentation significative des teneurs intracellulaires en proline avec l'augmentation des doses de Sb et As dans le milieu de culture, est constatée (Figure 27), mettant en évidence que les taux de proline accumulés lors de l'exposition à Sb sont plus élevés que ceux de l'As. Cette accumulation de la proline est maximale soit 223% à 20 mM Sb alors qu'à 30 mM Sb, elle diminue de 88% par rapport à la concentration précédente. D'après la matrice de *Pearson* (Tableau 13), la proline ne présente aucune corrélation avec les doses d'antimonite, le poids sec, la teneur en H₂O₂, et le MDA ; par conséquent, si les deux dernières concentrations (20, 30 mM Sb) sont éliminées, lorsque ($n=9$), la proline devient très significativement à hautement significativement corrélée avec les doses de Sb et les teneurs en H₂O₂ (Tableau 16 en annexe 4).

Quant, en présence d'arsenite dans le milieu, la teneur intracellulaire en proline augmente de manière hautement significative avec l'accroissement des doses d'As, à 5, 10 et 15 et 20 mM As la proline augmente respectivement de 124 %, 137%, 158% et 166% par rapport au témoin. L'analyse de la matrice de *Pearson* (Tableau 14), fait ressortir que la proline intracellulaire est hautement et positivement corrélée avec les doses d'As, d'H₂O₂ et de MDA, mais négativement avec le poids sec de *F. oxysporum*.

Il est très important de signaler que les teneurs intracellulaires en proline de *F. oxysporum* sont dix fois supérieures à celles d'*A. tubingenensis*.

4. Effet de Sb et d'As sur les biomarqueurs enzymatiques

4.1 Catalase (CAT)

Globalement, d'après la figure 28, les activités de la CAT d'*A. tubingensis* augmentent progressivement et de manière significative en fonction des concentrations de Sb dans les milieux de culture, excepté à 5 mM Sb où la CAT est significativement plus élevée que celle mesurée à 0 et 10 mM de Sb, et proche des activités mesurées à 20 et 30 mM de Sb, qui ont dépassé ceux du témoin de 163% et 197% respectivement. Les activités de la CAT montrent des corrélations positives et significatives à très significatives à hautement significatives avec les teneurs en H₂O₂, les concentrations de Sb et en proline respectivement, et aucune corrélation avec le poids sec et la teneur en MDA (Tableau 11).

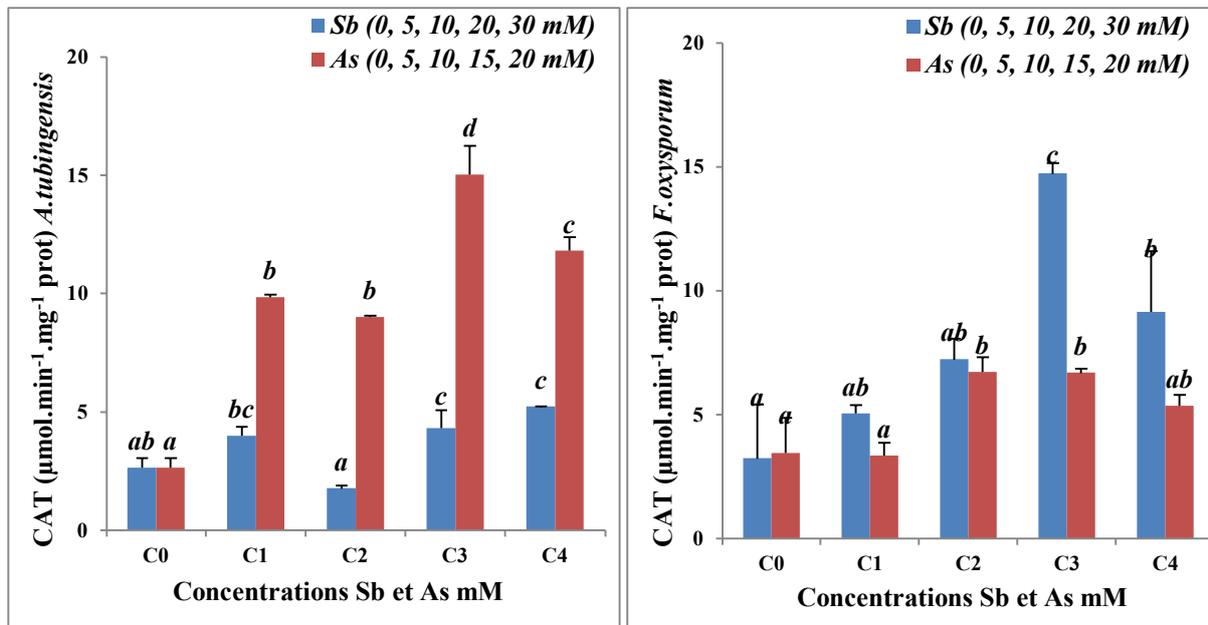


Figure 28 : Activités de la CAT d'*Aspergillus tubingensis* et de *Fusarium oxysporum*

Cette même souche, a montré une augmentation progressive et significative de l'activité de la CAT avec l'augmentation des concentrations d'As allant jusqu'à 15 mM d'As (Figure 28). L'augmentation de cette activité est d'environ 3,7 fois et 5,7 fois aux concentrations 5 et 15 mM d'As respectivement, comparativement au témoin. Cependant, une diminution significative de la CAT est observée à 20 mM As. L'activité de cette enzyme ne présente aucune corrélation avec la proline. En revanche, elle est positivement et hautement significativement corrélée aux teneurs en As, en H₂O₂ et en MDA, mais négativement et très significativement avec la croissance (Tableau 12).

L'activité de la catalase de *F. oxysporum* augmente progressivement et significativement avec l'accroissement des niveaux de stress dans le milieu de culture, généré par la présence de Sb. Cette augmentation est 1,5 fois, 2,2 fois et 4,5 fois plus importante que celle du témoin à 5, 10 et 20 mM Sb respectivement. Alors qu'à 30 mM Sb, l'activité de la CAT est réduite de 36% de la concentration de la CAT à 20 mM Sb. Cette activité enzymatique est positivement et très significativement corrélée avec les doses de Sb, du H₂O₂, du MDA et la teneur en proline, et aucune corrélation avec le poids sec (Tableau 13).

L'activité de la CAT de *F. oxysporum* augmente progressivement avec les doses d'As dans le milieu de culture. À 10 et 15 mM As, la CAT atteint des concentrations maximales, contrairement à 5 mM As où elle est inférieure à celle du témoin. La CAT est corrélée positivement et significativement à très significativement avec l'arsenic, le MDA et la proline respectivement, mais n'est pas corrélée avec les teneurs en H₂O₂ (Tableau 14), sauf si la dernière concentration, soit 20 mM As lorsque ($n=12$), est éliminée (Tableau 17 en annexe 4). La CAT devient positivement et très significativement corrélée avec l'H₂O₂.

Tableau 13 : Matrice de corrélation de *Pearson* entre toutes les variables analysées et les concentrations de Sb dans le milieu de culture pour *F. oxysporum*

Variables	Poids sec	H ₂ O ₂	MDA	Proline	CAT	SOD	POD	APX
Sb mM	-0,8617***	0,9717***	0,9673***	0,2900	0,6985**	-0,0814	-0,1215	0,4217
Poids sec	1	-0,8532***	-0,7900***	-0,1483	-0,4353	0,2232	0,2660	-0,2401
H₂O₂		1	0,9191***	0,2952	0,7267**	-0,2472	-0,2670	0,2864
MDA			1	0,3078	0,7295**	0,0118	0,0021	0,4933
Proline				1	0,7439**	0,5072	0,5937*	0,7599**
CAT					1	0,1479	0,2140	0,5902*
SOD						1	0,9586***	0,8290***
POD							1	0,8251***

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$

* $p < 0,05$; ** $p < 10^{-2}$, *** $p < 10^{-3}$ ($n = 15$)

4.2 Superoxyde dismutase (SOD)

Les activités de la SOD chez *A. tubingensis* progressent de façon constante, mais non significative aux concentrations de 0 à 20 mM Sb (Figure 29). Ce n'est qu'à 30 mM Sb que la SOD présente une activité significativement supérieure à celle du contrôle. Les activités de la SOD sont corrélées de manière positives et, de significatives à hautement significatives, respectivement avec la CAT, le MDA, les concentrations en Sb, l'H₂O₂ et les teneurs en proline, mais aucune avec le poids sec de la souche (Tableau 11).

La SOD de cette espèce augmente significativement et positivement avec l'accroissement des doses d'arsenite. Ces augmentations sont respectivement de 19%, 39%, et 70% par rapport au témoin, à 5, 15 et 20 mM As. Aussi, la SOD est positivement et, de significativement à très significativement corrélée avec les doses d'As, la proline, la CAT, et l'H₂O₂, mais négativement avec le poids sec (Tableau 12).

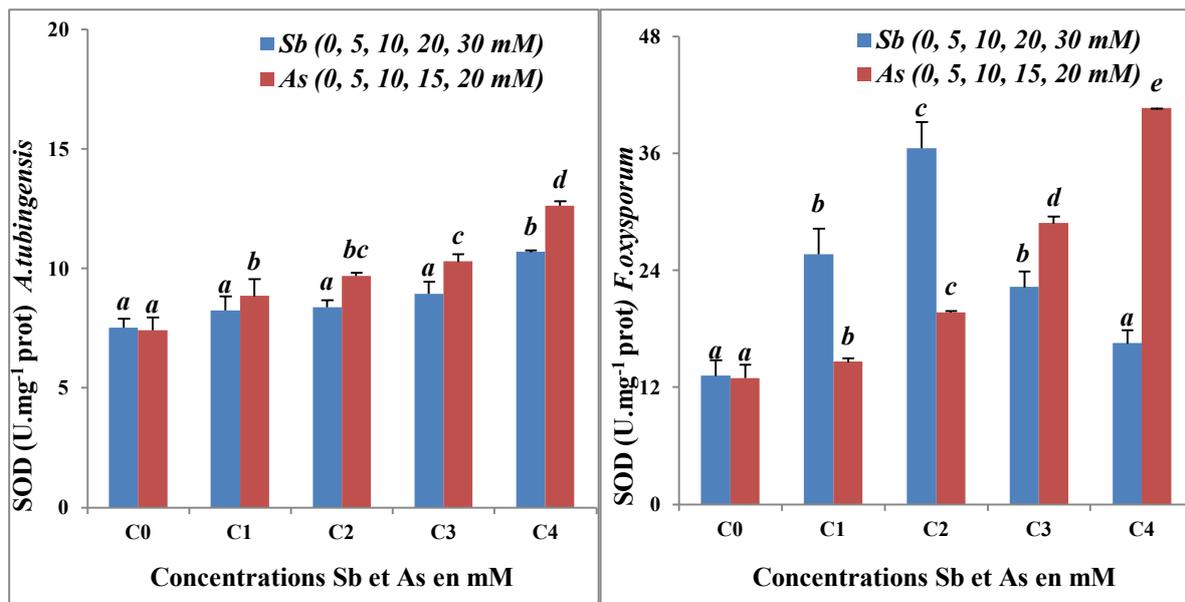


Figure 25 : Activités de la SOD d'*Aspergillus tubingensis* et de *Fusarium oxysporum*

Les activités de la SOD de *Fusarium oxysporum* en présence des ions de Sb sont présentées dans la figure 29. La SOD augmente de manière significative jusqu'à 10 mM Sb, où elle atteint son niveau le plus élevé de 277% par rapport au contrôle, pour diminuer significativement tout en restant supérieure à celle du contrôle. Cependant, elles ne présentent aucune corrélation avec les doses de Sb, la CAT et les autres biomarqueurs non enzymatiques (Tableau 13), sauf si les deux dernières concentrations de Sb (20 et 30 mM) soit ($n=9$) (Tableau 16 en annexe 4) ne sont pas considérées, alors celles-ci deviennent corrélées

positivement et de très significativement à hautement significativement avec le MDA, la proline, la CAT, l'antimoine et le contenu intracellulaire en H₂O₂. En revanche, la SOD reste non corrélée avec le poids sec.

Les activités de la superoxyde dismutase chez *F. oxysporum*, augmentent de manière hautement significative avec la progression d'As dans le milieu de culture, les quantités de la SOD à 15 et 20 mM As sont 2 fois et 3 fois plus importantes que celle du témoin. La matrice de corrélation (Tableau 14), montre que la SOD est corrélée positivement et hautement significativement avec l'arsenic, le H₂O₂, le MDA et la proline, mais négativement et significativement avec le poids sec.

Il est à signaler que les activités de la SOD chez *F. oxysporum* sont nettement supérieures à celles d'*A. tubingensis* en réponse au stress généré par les deux métalloïdes.

4.3 Peroxydase (POD)

L'activité de la POD d'*Aspergillus tubingensis* diminue avec l'augmentation du Sb dans le milieu. Cette diminution est de 25% à 10 mM, de 43% à 20 mM, et de 42% à 30 mM, mais une légère augmentation de cette activité à 5 mM par rapport au témoin est constatée (Figure 30). La matrice de *Pearson* (Tableau 11), indique d'une part que les corrélations entre la POD, le Sb et le MDA sont négatives et très significatives, contrairement avec le poids sec où la corrélation est positive et hautement significative, et d'autre part la POD ne montre aucune corrélation avec l'H₂O₂, la proline, la CAT et la SOD.

Cependant, cette souche montre une augmentation significative de la POD avec la progression d'As. L'augmentation de la POD à 5 et 15 mM As est 2 fois à 2,4 fois plus importante que celle du témoin. Notant qu'à 5 et 20 mM As, les concentrations de la POD sont similaires, tout en restant nettement supérieures à celles du contrôle. La POD présente une corrélation hautement significative et positive avec la CAT et le MDA, une corrélation de significative à très significative et positive avec l'As et l'H₂O₂, mais négative avec le poids sec et aucune corrélation avec la proline et la SOD (Tableau 12).

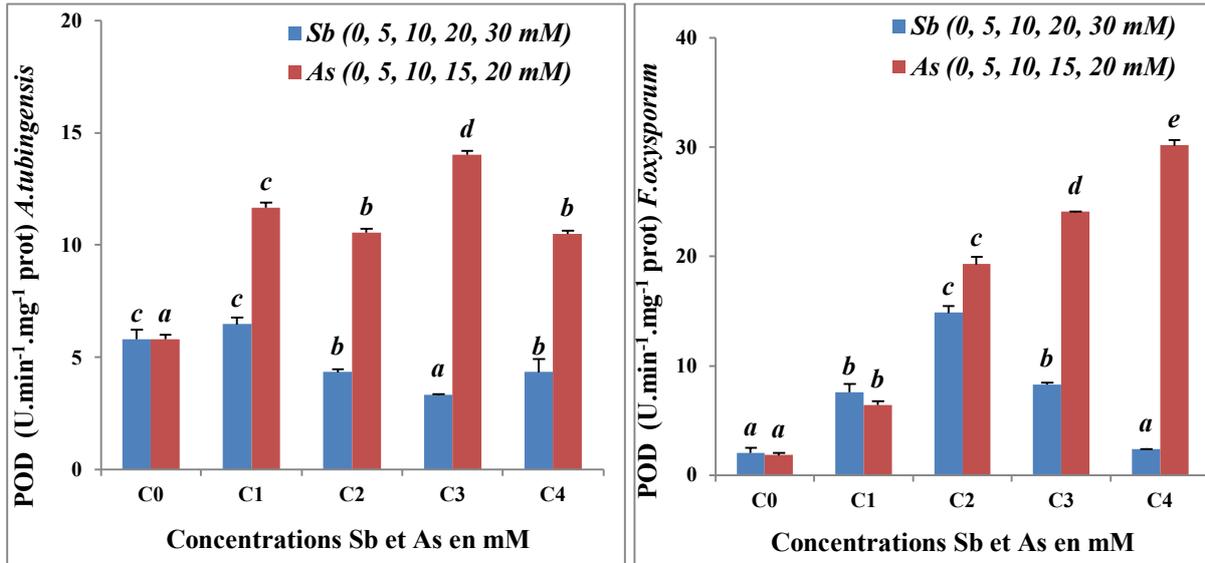


Figure 30 : Activités de la POD d’*Aspergillus tubingensis* et de *Fusarium oxysporum*

L’activité de la peroxydase chez *F. oxysporum* augmente progressivement en fonction de la quantité du Sb dans le milieu jusqu’à 10 mM Sb. Au-delà de cette dose, la POD diminue, atteignant une concentration égale à celle du témoin. La POD ne présente aucune corrélation avec toutes les variables hormis la proline et la SOD, où les corrélations sont positives et de très significatives à hautement significatives (Tableau 13).

En présence des doses croissantes d’As, l’activité de la POD de *F. oxysporum* augmente progressivement et significativement. Ainsi à 10, 15 et 20 mM As, elle est respectivement 11 fois, 13 fois et 17 fois plus élevées que du témoin. Le tableau 14 des corrélations, illustre que la POD est corrélée positivement et de très significativement à hautement significativement avec toutes les variables, mais négativement avec le poids sec.

Tableau 14 : Matrice de corrélation de *Pearson* entre toutes les variables analysées et les concentrations d’As dans le milieu de culture pour *F. oxysporum*

Variables	Poids sec	H ₂ O ₂	MDA	Proline	CAT	SOD	POD	APX
As mM	-0,8240***	0,8836***	0,9827***	0,9782***	0,6609**	0,9639***	0,9851***	0,9744***
Poids sec	1	-0,7419**	-0,8074***	-0,8422***	-0,3061	-0,7946**	-0,7566**	-0,7734***
H ₂ O ₂		1	0,9078***	0,8240***	0,3433	0,9344***	0,8370***	0,8521***
MDA			1	0,9486***	0,5921*	0,9891***	0,9661***	0,9581***
Proline				1	0,6858**	0,9160***	0,9622***	0,9397***
CAT					1	0,5182*	0,7479**	0,6786***
SOD						1	0,9325***	0,9344***
POD							1	0,9763***

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$

* $p < 0,05$; ** $p < 10^{-2}$, *** $p < 10^{-3}$ ($n = 15$)

4.4 Ascorbate peroxydase (APX)

Selon la figure 31, une diminution significative de l'activité de l'APX d'*A. tubingensis* avec l'augmentation de la concentration de Sb est remarquée, mais à 5 mM d'antimoine une légère augmentation de 106% de l'activité d'APX par rapport au témoin est notée. Par contre à 10, 20 et 30 mM la diminution de l'APX est de 22%, 43% et 25% respectivement. La matrice de *Pearson* (Tableau 11) indique que l'APX est corrélée positivement et hautement significativement avec le poids sec et la POD, mais négativement avec le Sb, le MDA et la SOD et sans aucune corrélation avec la CAT, l'H₂O₂ et la proline.

De même pour cette souche, en faibles doses d'arsenite une diminution progressive de l'APX est observée, et ce n'est qu'au-delà de 15 mM As que l'APX augmente de nouveau, atteignant à 20 mM As des concentrations proches de celle du témoin avec une augmentation de 26% par rapport à celle de la concentration 15 mM As. L'APX est corrélée négativement et de significativement à très significativement et à hautement significative avec l'As, le H₂O₂, la CAT, la POD et le MDA et aucune corrélation avec le poids sec, la proline et la SOD (Tableau 12).

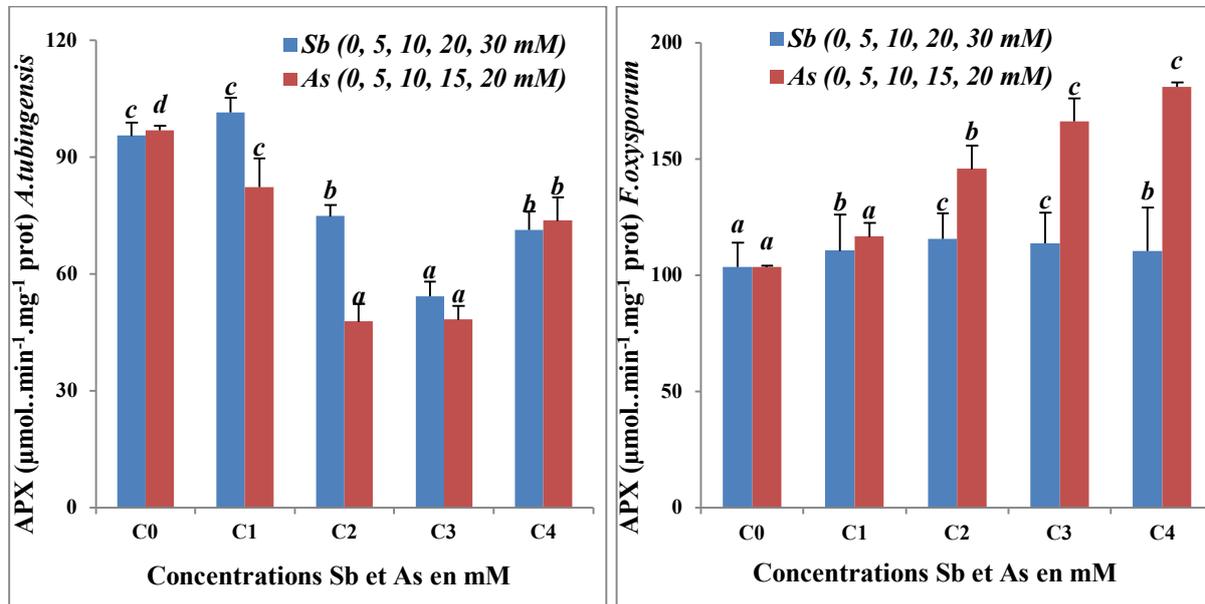


Figure 31 : Activités de l'APX d'*Aspergillus tubingensis* et de *Fusarium oxysporum*

L'APX de *F. oxysporum* augmente de manière non significative avec l'accroissement des doses d'antimonite dans le milieu de culture, en effet les concentrations de l'APX à 5 mM Sb et 30 mM sont similaires. Cette enzyme est corrélée positivement et hautement significativement avec la POD et la SOD, et de significativement à très significativement avec

la CAT et la proline (Tableau 13). Si en considérant l'ensemble des concentrations, l'APX n'est pas corrélée avec les doses de Sb, le poids sec, le H₂O₂ et le MDA ; mais si les doses 20 et 30 mM Sb sont soustraites ($n=9$), hormis le poids sec, ces variables deviennent hautement et significativement corrélées avec l'APX (Tableau 16 en annexe 4).

D'après la figure 31, l'APX de *F. oxysporum* augmente significativement et positivement avec les niveaux du stress induit par la présence d'As dans le milieu. Cette enzyme présente une parfaite corrélation avec toutes les variables (Tableau 14).

Discussion

Afin de contrôler les variations du pH des milieux de culture additionnés d'antimoine et d'arsenic avant et après culture, le bouillon Sabouraud tamponné est utilisé pour deux raisons majeures :

- La stabilisation du pH en utilisant le tampon citrate à pH 6,4 pour contrôler le stress généré par la toxicité de Sb et As, sachant que le mycoendophyte *Aspergillus tubingensis* est producteur d'acides organiques.
- La biodisponibilité des deux métalloïdes, car les variations des conditions physico-chimiques, notamment le pH et la température, peuvent jouer directement sur la biodisponibilité et la mobilité des éléments en faisant passer les métaux d'une forme à une autre. La biodisponibilité d'un métal lourd compte parmi les principaux facteurs conditionnant sa toxicité (Qasim, 2015).

La toxicité du milieu de culture généré par l'accroissement des doses d'antimonite et d'arsenite s'est traduite par la diminution significative de la croissance des deux mycoendophytes *Aspergillus tubingensis* et *Fusarium oxysporum* et, par conséquent, sur leur poids sec. Ceci est également révélé par la corrélation négative et de très significative à hautement significative, de la croissance en fonction des concentrations de Sb et As pour les deux souches. Une telle diminution pourrait s'expliquer par une modification probable des mécanismes physiologiques des souches testées en réponse à la toxicité des métalloïdes contenus dans le milieu, ce qui affecte la croissance fongique, inhibe les activités enzymatiques et désactive certaines enzymes (Blais et al., 2008 ; An et al., 2009 ; Abdul-Waheb et al., 2012 ; Finnegan et al., 2012).

La toxicité des métaux lourds affecte la taille, la diversité et l'activité de la population microbienne ainsi que leur structure génétique. Elle affecte également la morphologie, le métabolisme et la croissance des microorganismes en modifiant la structure des acides nucléiques, en perturbant les fonctions des membranes cellulaires, en inhibant les activités enzymatiques et la phosphorylation oxydative, en provoquant la peroxydation des lipides, l'altération de l'équilibre osmotique et la dénaturation des protéines (Chibuïke et al., 2014 ; Xie et al., 2016).

De plus, les métaux toxiques peuvent inactiver les protéines cellulaires en réagissant avec les groupes sulfhydryles des résidus de cystéine et les mécanismes de défense de remédiation par un thiol couramment utilisé par les cellules eucaryotes. Ces mécanismes de défense incluent les petites protéines riches en cystéine, connues sous le nom de métallothionéines, et les peptides de liaison aux métaux (*Metal-binding*) tels que les phytochélatines et le glutathion (Fashola et al., 2016 ; Xie et al., 2016).

Probablement en raison de l'adaptation préalable des mycoendophytes dans un environnement contaminé par l'antimoine et l'arsenic, les souches testées pourraient se développer en présence des concentrations de Sb et As aussi élevées et absorber de grandes quantités de métalloïdes considérées comme des concentrations destructives pour d'autres formes de vie. Plusieurs études, notamment celle de Ayangbenro et Babalola (2017) affirment que la tolérance des souches isolées varie en fonction de leur origine et des conditions environnementales dans lesquelles elles se développent.

La présence d'antimoine et d'arsenic dans le milieu de culture, a induit une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) majoritairement présent dans les cellules, pour trois raisons :

- une perturbation de certaines voies métaboliques.
- une inactivation (*down-regulation*) des enzymes du système antioxydant.
- un épuisement du stock des molécules de faibles poids moléculaire comme l'ascorbate, le glutathion, la vitamine E ou les caroténoïdes, qui possèdent des capacités antioxydantes.

En effet, les teneurs en H_2O_2 intracellulaire des souches *A. tubingensis* et *F. oxysporum* augmentent en même temps que celles de Sb et As dans le milieu. Cependant, ces teneurs en H_2O_2 sont générées à de faibles teneurs en faibles doses de Sb et d'As, qui ne sont pas significativement différentes de celles du milieu témoin. Ceci peut s'expliquer par la capacité d'*A. tubingensis* et *F. oxysporum* à maintenir l'équilibre de l' H_2O_2 produit par la cellule et l' H_2O_2 induit par la toxicité des métalloïdes.

Le H_2O_2 est un sous-produit inévitable de tous les organismes vivants aérobiques pour produire de l'énergie, selon Turrens (2003), la mitochondrie est le principal site de production d' H_2O_2 , où une synthèse continue du superoxyde est provoquée par une fuite d'électrons dans

laquelle une réduction incomplète du superoxyde donne naissance à l' H_2O_2 (Dalton et al., 1999).

Le H_2O_2 est considéré modérément toxique, comparé à d'autres espèces réactives d'oxygène (ROS), car il n'a pas d'électrons non appariés, mais il est capable de traverser facilement les membranes biologiques à travers les aquaporines et par conséquent causer des dommages oxydatifs loin du site de sa formation (Branco et al., 2004 ; Bienert et al., 2007). Le peroxyde d'hydrogène est relativement stable par rapport aux autres ROS, car il fait l'objet d'une attention particulière en tant que molécule de signalisation impliquée dans la régulation des processus biologiques spécifiques (Neill et al., 2002 ; Torres et al., 2002 ; Yan et al., 2007).

De plus, l' H_2O_2 peut réagir avec les ions des métaux de transition lors de la réaction de Fenton pour produire le radical hydroxyle, hautement toxique, qui exacerbe considérablement la cytotoxicité de l' H_2O_2 (Imlay, 2003 ; Li et al., 2008).

Il est à noter que le H_2O_2 est généré dans les cellules dans des conditions normales ainsi que dans des conditions de stress. De ce fait l'augmentation très significative des teneurs intracellulaires d' H_2O_2 observée pour les deux mycoendophytes pourrait s'expliquer par la présence de concentrations élevées d'arsenite et antimonite dans le milieu. Les résultats obtenus dans la présente étude sont en accord avec ceux de Krumova et al. (2009) pour *Humicola lutea* en présence de Cu^{2+} , de Chakraborty et al. (2012 ; 2014) pour *Aspergillus foetidus* en présence de Pb(II) et Cd(II), et de Lazarova et al. (2014) pour la levure filamenteuse *Trichosporon cutaneum* R57 en présence de doses croissantes d'ions de Cu, Cr et Cd.

La présence des ROS dans les cellules, notamment le H_2O_2 , entraîne une peroxydation des acides gras polyinsaturés dont le produit fini est le malondialdéhyde (MDA). Qui est, selon Demiral et Türkan (2005), un indicateur fiable de la formation des radicaux libres d'où son utilisation comme un biomarqueur de toxicité chez certains organismes vivants (Howlett et Avery, 1997 ; Pathak et al., 2006 ; Zhang et al., 2007 ; Tsikas, 2017).

L'augmentation hautement significative des teneurs en MDA d'*A. tubingensis* et *F. oxysporum* en fonction des concentrations en Sb et As du milieu, se traduit par une intensification du stress généré par la présence des ROS, et donc des dommages

membranaires des souches tests, dues à la peroxydation des acides gras poly-insaturés. Une telle réaction en présence de fortes concentrations de Sb et As dans le milieu est également constatée chez l'espèce végétale *Hedysarum pallidum* Desf. (Benhamdi et al., 2014) à partir de laquelle *A. tubingensis* et *F. oxysporum* ont été isolées.

Aussi, selon les travaux de Mukherjee et al. (2010), la peroxydation lipidique (LPO) chez *Aspergillus niger* augmente de façon constante avec l'élévation des doses d'arsenate. De même, Chakraborty et al. (2014) rapportent que le cadmium induit une peroxydation de la membrane cellulaire de la souche *Aspergillus foetidus*, provoquant des lésions aux parois cellulaires, aussi pour Chandran et al. (2014) qui ont montré que le Cu^{2+} et le Pb^{2+} provoquent une peroxydation lipidique chez *Aspergillus niger*.

La peroxydation lipidique entraîne généralement selon Shahid (2014) :

- une augmentation des fuites membranaires des substances qui ne traversent pas normalement les membranes, sauf *via* les canaux spécifiques,
- une diminution de la fluidité membranaire, ce qui facilite l'échange des phospholipides entre les deux bicouches,
- des dommages aux protéines membranaires qui inactivent les récepteurs, les enzymes et les canaux ioniques.

Un tel effet est observé dans le cas d'*A. tubingensis* en présence des doses croissantes de Sb et dans le cas de *F. oxysporum* en présence des doses croissantes de Sb et As, mis d'ailleurs en évidence par les corrélations négatives et de très significatives à hautement significatives, avec le poids sec, et des corrélations positives et de significatives à hautement significatives, avec les teneurs en H_2O_2 et les concentrations de Sb et As dans le milieu.

Au contraire d'*A. tubingensis* en présence des ions d'arsenite, chez qui l'absence de corrélation entre les teneurs en As et en MDA, lorsque toutes les valeurs sont considérées, est liée à la diminution significative du contenu en MDA à 20 mM As. Cela peut s'expliquer par le fait qu'une très grande quantité d' H_2O_2 est produite à cette dose, provoquant une importante altération des fonctions métaboliques de la souche, ce qui a entraîné une diminution de la synthèse du MDA également observée par Kassa-Laouar et al. (2020) pour *Serratia marcescens* en présence de Sb (III).

La proline est un acide aminé qui agit comme agent chélatant pour certains métaux lourds ; permettant de protéger les cellules des dommages causés par divers stress (Kaino et Takagi, 2008 ; 2009).

Il a été signalé que la proline réduit les effets néfastes des ROS en inhibant la peroxydation lipidique (Hayat et al., 2012), en piégeant les ROS, tels que les radicaux hydroxyles (Smirnoff et Cumbes, 1989), les anions superoxydes (Kaul et al., 2008) et le H₂O₂ (Wang et al., 2009).

En outre, d'après Takagi et al. (2016) la proline confère une tolérance aux espèces vivantes exposées aux stress environnementaux, en augmentant les activités de la catalase et de la superoxyde dismutase et en diminuant également le taux de la peroxydation lipidique (Hoque et al., 2007 ; Islam et al., 2009).

Généralement, les teneurs intracellulaires en proline d'*A. tubingensis* et *F. oxysporum*, augmentent parallèlement avec l'augmentation des doses d'antimonite et d'arsenite dans le milieu, et aussi celles du H₂O₂ et du MDA. La synthèse de la proline est déclenchée par la présence des ROS générés par la toxicité des métalloïdes. Cela est confirmé par les corrélations positives et significatives, à très significatives et à hautement significatives entre les teneurs en proline et les traitements aux Sb et As, et les teneurs en H₂O₂ et en MDA des souches étudiées. Ce qui suggère que la proline est impliquée dans l'élimination de l'H₂O₂ et dans la prévention de la peroxydation lipidique.

De plus, les corrélations négatives entre la proline et le poids sec suggèrent que la réduction de la croissance due à la toxicité des métalloïdes, est le facteur inducteur de la production de proline. De ce fait, les deux mycoendophytes étudiés produisent de la proline intracellulaire qui leur permet de résister à la toxicité des métalloïdes, de réduire leurs effets délétères sur le métabolisme et d'empêcher la réduction de leur croissance ; ce qui révèle une adaptation importante des mycoendophytes à la présence des teneurs excessives en Sb et As.

En effet, selon Sharma et Dietz (2006), et Raj et Mohan (2016), des taux élevés de proline intracellulaire sont des caractéristiques propres aux populations hypertolérantes aux métaux lourds, suggérant que la proline intracellulaire joue un rôle fonctionnel dans la résistance élevée aux métaux.

D'ailleurs, selon Matysik et al. (2002) la proline, composant des parois cellulaires, fonctionne comme un osmolyte piègeur de ROS, régulateur du potentiel redox cellulaire, chélateur de métaux, inhibiteur de la LPO et stabilisateur des macromolécules.

Les résultats constatés dans la présente analyse sont corroborés par les travaux de Chakraborty et al. (2012 ; 2014) qui en étudiant l'impact de la toxicité du Pb (II) et du Cd (II) sur *Aspergillus foetidus* rapportent que la proline intracellulaire augmente de manière progressive et significative avec celle de ces deux éléments dans le milieu.

Généralement, les corrélations positives de significatives, à très significatives, et à hautement significatives de la proline avec CAT et SOD obtenues, montrent que la production de la proline est liée à l'induction de ces activités enzymatiques. Pour Zouari et al. (2016) chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L. cv Deglet Nour) la proline intervient dans l'atténuation du stress lié au cadmium en favorisant l'activité de la CAT. Ce qui pourrait non seulement être le cas pour *A. tubingensis* et *F. oxysporum* pour la CAT mais également pour la SOD.

Chez *A. tubingensis* et *F. oxysporum* une augmentation significative de l'activité de la CAT avec les concentrations de Sb et d'As dans le milieu est mise en évidence, qui se fait en même temps que l'augmentation du H₂O₂ ; leurs corrélations positives et très significatives à hautement significatives montrent que l'activité de la CAT est déclenchée par l'accumulation du H₂O₂ induits par la toxicité de Sb et d'As. Cela supposant que la CAT participe à l'élimination de H₂O₂.

Les catalases sont connues pour être impliquées dans l'un des mécanismes qui protègent les cellules contre la peroxydation lipidique et les dommages des composants cellulaires causés par H₂O₂ et les autres espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Imlay et Linn, 1988 ; Teng et al., 2018). Néanmoins, aux fortes concentrations en Sb et As, une réduction significative de l'activité de la CAT est notée peut-être due à une hyperproduction d'H₂O₂ intracellulaire produite par les deux souches fongiques.

De plus, selon Polydoros et Scandalios (1999), l'activité de la catalase est directement régulée par les concentrations en H₂O₂ dans le milieu, où l'accumulation élevée peut réduire l'activité de la CAT. Aussi, Cyrne et al. (2003) ont signalé que le H₂O₂ pourrait être réduit avec la participation du glutathion en tant qu'antioxydant alternatif de protection contre le

H₂O₂. L'importance du glutathion dans la détoxification des métaux lourds a été observée par de nombreux auteurs entre autres Vido et al. (2001) chez *S. cerevisiae*, en présence du cadmium.

Dans le présent travail, l'H₂O₂ résultant de la toxicité des métalloïdes est éliminé par la CAT produite par *A. tubingensis* et *F. oxysporum*, qui neutralise ou réduit ses effets toxiques. Un tel résultat est confirmé par des corrélations positives et de significatives à très significatives et à hautement significatives, de la CAT avec les teneurs en H₂O₂, en MDA et en proline pour les deux mycoendophytes en présence de Sb et As. Toutefois, hormis le poids sec d'*Aspergillus tubingensis* en présence des ions d'arsenite, aucune corrélation entre la CAT et le poids sec n'a été notée.

Pour Benhamdi et al. (2014) le MDA et l'activité de la CAT de la plante steppique *H. pallidum* ont augmenté d'une manière très significative avec l'augmentation de la pollution par l'antimoine et l'arsenic dans le sol. Une telle augmentation pourrait donc être liée à la présence d'*A. tubingensis* et *F. oxysporum* dans les racines d'*H. pallidum*.

Les résultats observés dans cette analyse sont cohérents avec ceux de Krumova et al. (2009) sur l'effet du cuivre chez *Humicola lutea*, dont l'activité catalasique augmente en fonction du stress généré par le Cu, et ceux de Mukherjee et al. (2010) chez *Aspergillus niger* exposé à 25 et 50 mg/L d'arsenic, qui ont induit une bonne réponse par la synthèse de la CAT mais au-delà de ces teneurs la souche a perdu sa capacité d'éliminer le H₂O₂ formé. Également Cavalcanti-Luna et al. (2015) ont rapporté que l'exposition d'*Aspergillus niger* au Cu a provoqué une réponse antioxydante par la synthèse de la CAT, qui tend à diminuer à la plus forte (2 mM Cu) concentration. Cependant, Gil et al. (2017) suggèrent que la diminution considérable de l'activité de la catalase est causée par la présence de radicaux superoxydes.

L'augmentation de l'activité de la SOD d'*A. tubingensis* et de *F. oxysporum* avec l'augmentation des concentrations de Sb et As dans le milieu, suit exactement celle de leurs teneurs en H₂O₂. Ce qui indique que cette enzyme est impliquée dans la détoxification des radicaux superoxydes générés par la présence de Sb et d'As dans le milieu.

En effet, selon Bowler et al. (2014) la superoxyde dismutase (SOD) joue un rôle majeur dans la défense contre les radicaux superoxydes en catalysant le O₂^{•-} en H₂O₂ et O₂, et Benhamdi et al. (2014) ont également mis en évidence une augmentation de l'activité de la

SOD d'*H. pallidum* en fonction de la contamination des sols par le Sb et l'As, qui était plus importante dans les racines que dans les parties aériennes de la plante. Ce qui permet de penser que *A. tubingensis* et *F. oxysporum* pourraient favoriser l'augmentation de l'activité de la SOD d'*H. pallidum*.

La superoxyde dismutase (SOD) est une autre enzyme antioxydante qui protège les cellules contre le stress oxydatif. Ainsi, une augmentation significative de l'activité de la SOD chez *A. tubingensis* et *F. oxysporum* avec l'augmentation des traitements en Sb et As dans le milieu de culture est observée. Des corrélations positives et de significatives à hautement significatives ont été obtenues, à l'exception de *F. oxysporum* lorsqu'il est cultivé avec de fortes doses de Sb. Mais si la plus haute concentration (30 mM) n'est pas considérée, la SOD devient corrélée positivement et hautement significative en présence de l'antimonite. Ces corrélations prouvent que ces deux métalloïdes ont induit la synthèse de la SOD par les deux mycoendophytes.

La diminution d'activité de la SOD chez *Fusarium oxysporum* en présence de fortes concentrations d'antimonite est la conséquence d'une sensibilité de l'enzyme à l'excès d' H_2O_2 produit dans les cellules comme constatée par Benhamdi et al. (2014). La baisse de l'activité de la SOD à forte concentration 300 ppm Cu^{2+} a été rapportée par Krumova et al. (2009) chez *Humicola lutea*.

Selon Demidchik (2015) la SOD réagit avec les radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) pour produire du H_2O_2 et de O_2 ($2 O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$). La production d' H_2O_2 par la SOD permet de réduire la quantité de $O_2^{\cdot-}$ générée par le stress métallique et d'éviter la formation de radicaux hydroxyles (OH^{\cdot}) dans la réaction d'Haber-Weiss. Ces radicaux hydroxyles sont les espèces les plus réactives responsables de la LPO et par conséquent, de la production du MDA.

Les corrélations positives et de très significatives à hautement significatives de la SOD avec le H_2O_2 et le MDA, suggèrent que la SOD est impliquée dans la production du H_2O_2 et du MDA. Le H_2O_2 un oxydant très fréquent, serait éliminé par la proline intracellulaire et la CAT, ce qui explique donc les corrélations positives et très significatives à hautement significatives trouvées entre la SOD, les activités de la CAT, les teneurs en H_2O_2 et en proline.

La SOD et la CAT sont considérées comme des enzymes de piégeage, qui servent de première ligne de défense contre le stress oxydatif en empêchant l'accumulation de ROS (Abrashev et al., 2008).

Chattopadhyay et al. (2011), et Lazarova et al. (2014), rapportent que les activités élevées de la SOD et de la CAT sont associées à la résistance induite par les mycètes en fonction des différents facteurs de stress. Ces enzymes jouent un rôle crucial dans la détoxification cellulaire, car elles contrôlent les niveaux des radicaux superoxydes et de peroxyde d'hydrogène (Bai et al., 2002 ; Azevedo et al., 2007).

Benhamdi et al. (2014) ont également mis en évidence une augmentation de l'activité de la SOD, plus importante dans les racines d'*H. pallidum* que dans ses parties aériennes. De même chez *A. tubingensis* et *F. oxysporum* isolés à partir des racines de cette plante pourraient jouer un rôle dans l'augmentation de l'activité de la SOD de leur hôte.

Des résultats similaires sont observés chez *Aspergillus nidulans* en présence de cadmium (Guelfi et al., 2003), chez *Candida intermedia* en présence des métaux lourds (Fujs et al., 2005), et chez *Aspergillus niger* B77 en présence de Cd (II) (Todorova et al., 2007).

Une autre classe d'enzymes responsables de la dégradation de l' H_2O_2 est les peroxydases considérées comme des marqueurs de toxicité des métaux lourds, et sont capables de réduire le H_2O_2 en H_2O , ayant une grande spécificité pour les substrats phénoliques et une plus grande affinité pour H_2O_2 que la CAT (Radwan et al., 2010).

Kreiner et al. (2002), et Angelova et al. (2005) chez les champignons filamenteux deux peroxydases la CAT et les POX sont associées à la détoxification de H_2O_2 ; la CAT catalyse la décomposition du H_2O_2 en eau et en oxygène, tandis que les POX réduisent d'autres peroxydes tels que l'hydroperoxyde organique, ou l'hydroperoxyde lipidique aux dépens des co-substrats et du NADPH.

La peroxydase (POD) est présente dans les vacuoles, la paroi cellulaire, le cytosol et les espaces extracellulaires (Shahid et al., 2014).

Les activités de la POD chez *Aspergillus tubingensis* et *Fusarium oxysporum* induites par l'exposition l'antimonite et l'arsenite s'élèvent progressivement avec l'augmentation des doses de ces métalloïdes dans le milieu. Les réponses cellulaires sont liées au processus

d'adaptation lors de la survenue du stress oxydatif, provoquant une importante activité des enzymes antioxydantes et / ou une augmentation de la concentration en composants antioxydants non enzymatiques tels que l'acide ascorbique, les β -carotènes, les tocophérols et la vitamine E. De plus, les PODs sont essentielles au maintien de l'équilibre rédox cellulaire et sont activées lors des contraintes induites par les métaux lourds (Pócsi et al., 2004).

Chez les deux mycoendophytes en présence de Sb et As, les POD sont corrélées positivement et de très significativement à hautement significativement, avec la concentration métallique, le H_2O_2 , le MDA, la proline, et la CAT, comme apparaît aux matrices de *Pearson*. Cependant, l'absence de corrélation entre la POD et la SOD permet de suggérer que le H_2O_2 résultant de la dismutation de l'anion superoxyde est catalysé par la CAT.

La baisse des activités de la POD peut être causée par son incapacité à éliminer l'excès du H_2O_2 ou par la formation d'un complexe protéique avec les métaux, en provoquant des modifications au niveau de la structure de l'enzyme (Hou et al., 2007).

Les résultats obtenus par Abrashev et al. (2008) ont montré une régression de la synthèse de la POD d'*A. niger* 26 lors de son exposition à des températures extrêmes, Garg et al. (2012) ont observé une diminution de la peroxydase chez le champignon mycorhizien des pois d'Angole (*Cajanus cajan* L.) poussant sur un sol contaminé par le Cd et Pb, et Cavalcanti-Luna et al. (2015) ont signalé une atténuation de la POD chez *Aspergillus niger* UCP1261 en présence de doses croissantes de cuivre, sont similaires à ceux obtenus dans la présente étude.

Le principal rôle physiologique des ascorbates peroxydases est la réduction du H_2O_2 par oxydation concomitante de l'ascorbate en monodéshydroascorbate (Shigeoka et al., 2002). Dans le cadre du cycle ascorbate-glutathion, les APX dégradent les niveaux toxiques de H_2O_2 dans les compartiments cellulaires où aucune catalase n'est présente (del Río et al., 2002).

En outre, Reddy et al. (2009) ont signalé que l'APX contrôle le niveau de H_2O_2 produit lors de la signalisation intracellulaire, influençant ainsi l'induction l'expression des protéines de détoxification. Il faut mentionner que toutes les peroxydases hémiques présentent une faible ou très faible activité de catalase en l'absence de donneurs (un ou deux) d'électrons appropriés (Hiner et al., 2001).

L'activité de l'ascorbate peroxydase s'est révélée inductible en parallèle avec d'autres enzymes antioxydantes telles que la catalase, la superoxyde dismutase ou la glutathion peroxydase en réponse aux stress environnementaux, notamment au stress métallique.

Il a également été prouvé que l'expression des gènes APX cytosoliques était régulée positivement en réponse à des signaux biochimiques divers, tels que des taux élevés de H₂O₂ cellulaire, de l'acide abscisique, de l'acide salicylique, de la cantharidine et des endothalls (inhibiteurs de la protéine phosphatase) et du sulfate de cuivre (Zámocký et al., 2010).

Chez *Fusarium oxysporum* l'augmentation de l'activité de l'APX, indique son rôle crucial dans l'élimination des ROS durant le stress induit par le Sb et l'As ; plus les quantités d'antimonite et d'arsenite augmentent dans le milieu de culture, plus le mycoendophyte devient stressé, plus il produit cette enzyme pour se protéger contre les dommages oxydatifs, comme constaté par Benhamdi et al. (2014) chez *Hedysarum pallidum* d'où *F. oxysporum* a été isolé. Ceci est corroboré par les corrélations positives et de très significatives à hautement significatives entre l'APX, les toxiques, le H₂O₂, le MDA, la proline, la CAT, la SOD et la POD.

Chez *Aspergillus tubingensis* l'inhibition de l'activité de l'APX en présence de Sb et As est probablement due à l'excès des ROS qui affectent la structure de l'enzyme, comme signalé par Benhamdi et al. (2014) dans les racines de *Lygeum spartum*, ceci est prouvé par les corrélations négatives et hautement significatives de l'APX avec le MDA et la SOD.

Comme l'a signalé Asada et al. (1992), l'ascorbate peroxydase est une enzyme qui piège le peroxyde d'hydrogène exclusivement chloroplastique. Or d'autres auteurs signalent que l'ascorbate peroxydase a été purifié à partir de l'œil bovin et son extrémité N-terminale s'est avérée homologue à l'enzyme végétale, ce qui implique que l'ascorbate peroxydase n'est pas spécifique aux plantes (Wada et al., 1998 ; Hiraga et al., 2001).

La présence de protéines de type végétal dans les protozoaires, les métazoaires et les champignons a déjà été observée. Ce qui laisse supposer que ces gènes auraient pu être acquis par le biais d'événements antérieurs d'endosymbiose et de transfert horizontal de gènes (Doolittle, 1998 ; Yuan et al., 2008).

De plus, Baroja-Mazo et al. (2005) rapportent que les champignons ne synthétisent normalement pas l'ascorbate, mais des espèces fongiques étudiées contiennent le D-Erythroascorbate (D-EAA), qui est un analogue de l'ascorbate C5.

La présence de D-EAA à la place de L-ascorbate a été observée chez les ascomycètes, les basidiomycètes et les zygomycètes, aussi chez le zygomycète *Phycomyces blakesleeanus*, les deux composés D-Erythroascorbate (DEAA) et D-glucoside erythroascorbate (D-EAAG) peuvent agir comme des antioxydants (Baroja-Mazo et al., 2005).

L'APX est un membre de la classe I et de la classe III de la superfamille des peroxydases à hème (Walinder, 1992), ces deux superfamilles sont nées indépendamment l'une de l'autre, de sorte que leur structure primaire et tertiaire, et la nature de leur groupe prosthétique diffèrent considérablement. La classe I de la superfamille des bactéries, des champignons et des végétaux (parfois appelée « superfamille non animale ») est représentée par les catalase-peroxydases (EC 1.11.1.6), les ascorbates peroxydases (EC 1.11.1.11), et les cytochromes *c* peroxydases (EC 1.11.1.5) (Zámocký et al., 2008).

La comparaison des structures des sous-unités de la catalase-peroxydase (KatG), la cytochrome *c* peroxydase (CcP) et l'APX, montre un degré élevé de similitude entre les éléments structuraux secondaires et tertiaires, encore plus prononcé dans l'architecture des cavités hémiques respectives (Zámocký et al., 2010). En outre, selon Mehareenna et al. (2008) l'APx et la CcP sont étroitement liés suggérant que ces deux enzymes utilisent l'ascorbate comme donneur d'électrons.

Cependant, les propriétés fondamentales des ascorbates peroxydases sont très différentes de celles des guaiacols peroxydases purifiées des tissus végétaux. Les analyses des séquences d'acides aminés et d'autres propriétés moléculaires indiquent que l'ascorbate peroxydase ressemble au cytochrome *c* peroxydase des champignons, plutôt qu'au guaiacol peroxydase des plantes. Par ailleurs, il a été rapporté et que les peroxydases levuriennes et des végétaux piègeuses de peroxyde d'hydrogène ont le même ancêtre.

Les analyses phylogénétiques de Zámocký' et al. (2010) mettent en évidence deux nouvelles sous-familles de la classe I de la super-famille des catalases-peroxydases, appelées peroxydases hybrides de types A et B. La sous-famille de type hybride A peut fournir un lien entre les cytochromes *c* peroxydases et l'APX, tandis que la sous-famille de type hybride B,

est évidemment un intermédiaire entre la sous-famille d'APX abondante et largement répandue, et une branche de la classe II des peroxydases fongiques.

De plus, la reconstruction phylogénétique de Zámocký et al. (2014) montre que les peroxydases de type hybride B sont un clade frère des peroxydases de la classe III et des apparentées d'APX. Cet auteur a aussi signalé que les peroxydases de type hybride B se retrouvent dans tous les phylums fongiques, principalement chez les phytopathogènes dont l'évolution s'est produite parallèlement à celle des peroxydases de classe III des plantes terrestres (Zámocký et al., 2017).

Compte tenu des données bibliographiques, l'APX mesurée dans la présente étude peut être une APX qui a utilisé le D-Erythroascorbate (D-EAA) un analogue de l'ascorbate C5 produit par les deux mycoendophytes tests, ou encore une cytochrome *c* peroxydase, ou une enzyme intermédiaire entre la cytochrome *c* peroxydase et l'APX chloroplastique, ou bien une peroxydase de type hybride B utilisant l'acide ascorbique comme donneur d'électron. Bien que l'ascorbate soit un substrat naturel pour de nombreuses peroxydases, des tests biochimiques *in vitro* ont révélé des activités d'APX dans des échantillons non photosynthétiques (Hussein et Joo, 2013 ; Elahi et al., 2018 ; 2019)

Il est important de signaler que l'APX a été extraite de mycoendophytes isolées des racines de la plante *H. pallidum* qui a montré une excellente réponse antioxydante vis-à-vis de la toxicité de son environnement par une importante synthèse d'ascorbate peroxydase. De plus, vu que les interactions plantes-microorganismes, endophytes ou symbiotiques sont très complexes, ce qui laisse supposer que le gène responsable de la synthèse de l'APX a été transféré horizontalement (conjugaison) de la plante hôte vers le symbionte et par conséquent l'expression du gène chez les mycoendophytes.

De ce fait une recherche plus approfondie doit être menée sur ce volet, pour une meilleure caractérisation de cette enzyme pour apporter d'avantages d'informations sur son origine.

En conclusion, l'évaluation du profil biochimique antioxydant des mycoendophytes étudiés *A. tubingensis* et *F. oxysporum* en réponse à la toxicité induite par l'antimonite et l'arsenite, a tout de même permis de déduire leur rôle primordial dans la réduction de la

toxicité métallique, et par conséquent leur potentiel de bioremédiation des sols contaminés par le Sb et l'As notamment les milieux aquatiques.

Conclusion

Les activités anthropiques, telles que l'agriculture, les mines et les industries, ont augmenté de manière exponentielle la quantité de métaux lourds dans de nombreux écosystèmes, notamment au cours du siècle dernier. Ces polluants représentent une menace pour toutes les formes de vie, au-delà d'un certain seuil. Toutefois, la bioremédiation et plus spécifiquement la mycoremédiation, est une technologie écologiquement rationnelle qui limite les inconvénients associés aux technologies conventionnelles sur les ressources naturelles.

Dans la région de Djebel Hamimat, le niveau de contamination des sols par le Sb et l'As est très élevé. Ce qui a provoqué une modification de la végétation spontanée par la disparition de certaines espèces et l'adaptation d'autres espèces accumulatrices et /ou tolérantes à savoir *H. pallidum* et *L. spartum*. De ce fait, des investigations établies sur l'hypothèse que ces plantes hébergent dans leurs racines une mycoflore capable de tolérer des doses élevées en métalloïdes, de favoriser la croissance de leurs hôtes, de diminuer la phytotoxicité de Sb et d'As, et de moduler la translocation et l'accumulation de ces métalloïdes dans les plantes hôtes. Ainsi, elle protège leurs hôtes par la synthèse d'enzymes antioxydantes, en réponse au stress oxydatif induit par la toxicité du milieu.

A travers les résultats obtenus de la présente thèse, nous retiendrons de la première partie, les points suivants :

- ✓ La mise en évidence, pour la première fois en Algérie, que les racines d'*Hedysarum pallidum* Desf. et *Lygeum spartum* L, abritent un groupe très diversifié de mycoendophytes présentant un statut quantitatif et qualitatif (71 taxons pour *H. pallidum* et 130 taxons pour *L. spartum*), d'où des fréquences de colonisation de 65% pour *H. pallidum* et de 97% pour *L. spartum*, avec une prédominance du genre *Aspergillus*, qui semble présenter le groupe fongique colonisateur le plus adapté au mode de vie endophyte, pouvant jouer un rôle potentiel dans la tolérance de l'hôte végétal aux conditions stressantes entre autres la pollution par les métalloïdes. De plus, l'évaluation de la diversité phénotypique des mycoendophytes associées aux racines d'*H. pallidum* et *L. spartum*, a octroyé une originalité et une valeur scientifique grandissante à ce travail.
- ✓ La sélection et l'identification moléculaire de deux mycoendophytes résistants aux très fortes concentrations de Sb et d'As. Ces espèces sont identifiées par le séquençage des marqueurs phylogénétiques et la comparaison des séquences d'ADNr avec les données

de la banque « *GenBank* » des espèces apparentées, qui ont permis de les identifier jusqu'à l'espèce à savoir : *Aspergillus tubingensis* portant le numéro d'accèsion **MH189391.1** qui tolérait 500 mM Sb soit une CMI : $500 > CMI > 550$ mM et *Fusarium oxysporum* qui résistait jusqu'à 30 mM As avec une CMI ≈ 40 mM, ces deux espèces sont issues du système racinaire d'*Hedysarum pallidum* Desf.

La seconde partie, a fait ressortir que la toxicité de l'antimonite et l'arsenite a un impact sur la croissance fongique des mycoendophytes *A. tubingensis* et *F. oxysporum* par une diminution significative de leurs poids secs avec l'augmentation des doses de Sb et d'As dans le milieu de culture. Les tests de toxicité révèlent que la biomasse d'*A. tubingensis* peut accumuler des quantités importantes d'antimoine et d'arsenic, contrairement à *F. oxysporum*. Ce phénomène cellulaire n'est toutefois pas concluant vu que le dosage de ces métalloïdes dans le milieu de culture résiduel n'a pas été effectué en raison des difficultés liées aux dosages de Sb et d'As. Ainsi et, d'après la littérature, le mécanisme de bioaccumulation développé par les champignons et plus précisément les endophytes, est considéré comme un éventuel moyen de bioremédiation, bien que ce mécanisme utilisant une biomasse viable, ait de nombreuses limitations pour l'accumulation de métaux lourds.

Quant à la dernière partie, les analyses *in vitro* du potentiel antioxydant d'*Aspergillus tubingensis* et *Fusarium oxysporum*, ont mis en évidence que le niveau élevé en métalloïdes dans le milieu de culture, induit chez ces mycoenophytes une génération de radicaux libres tels que l'anion superoxyde, et par l'action de la SOD, une libération importante du H₂O₂, ce qui provoque une peroxydation des acides gras polyinsaturés donnant du MDA et par conséquent une stimulation de la production d'enzymes antioxydantes, à savoir la CAT, la POD et l'APX pour lutter contre les ROS générés par la toxicité de Sb et d'As. L'induction de la production de la proline et des enzymes antioxydantes par *A. tubingensis* et *F. oxysporum* en présence de concentrations importantes de Sb et As dans le milieu, illustre la capacité de ces espèces à s'adapter aux conditions stressantes, confirmée par les corrélations positives et de significatives à très significatives et à hautement significatives obtenues en étudiant l'effet de ces métalloïdes sur les biomarqueurs de toxicité. Il ressort que les deux espèces s'adaptent à des niveaux élevés de métalloïdes mais de manière différente, leur système antioxydant répondant différemment, du point de vue quantitatif et qualitatif. Ce qui suggère que ces mycoendophytes seraient des symbiotes d'*H. pallidum* et *L. spartum* impliquées dans l'aptitude de celles-ci à se développer sur les déblais miniers d'antimoine, ce qui pourrait faire

Conclusion

de ces mycoendophytes, seuls ou associés à des plantes hôtes, des agents potentiels pour la bioremédiation des sols et les environnements aquatiques contaminés par Sb et As.

Comme perspectives, nous proposons de :

- ✓ Mettre en évidence l'impact d'autres métaux qui existent conjointement avec le Sb et l'As dans la zone minière sur l'aptitude de ces mycoendophytes isolés.
- ✓ Etudier les mécanismes moléculaires de résistance vis-à-vis le Sb et l'As par les techniques de transformation de cellules compétentes par l'ADN génomique des mycoendophytes étudiés.
- ✓ Elucider les mécanismes précis par lesquels les champignons endophytes interviennent dans la résistance à l'antimoine et l'arsenic et la stimulation de la croissance de leurs plantes hôte.
- ✓ Utiliser ces souches endophytes résistantes pour la production des molécules bioactives, notamment les biosurfactants d'intérêts biotechnologiques pour la remédiation des environnements contaminés.

Enfin pour conclure, les résultats obtenus dans ce travail ont fait l'objet d'une publication dans une revue de renommée dotée d'un IF, et de plusieurs communications dans des congrès internationaux.

Références bibliographiques

- Abbas SH, Ismail IM, Mostafa TM, Sulaymon AH. 2014. Biosorption of heavy metals: a review. *JCST* 3, 74–102.
- Abdul-Wahab S, Marikar F. 2012. The environmental impact of gold mines: Pollution by heavy metals. *Open Eng.* 2: 304–313.
- Abrashev RI, Pashova SB, Stefanova LN, Vassilev SV, Dolashka-Angelova PA, Angelova MB. 2008. Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger* 26. *Can J Microbiol.* 54(12):977-83.
- Aguirre J, Rios-Momberg M, Hewitt D, Hansberg W. 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* 13: 111–118.
- Ahluwalia SS, Goyal D. 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresour Technol.* 98: 2243–2257.
- Ahamed S, Sengupta MK, Mukherjee A, Hossain MA, Das B, Nayak B, Pal A, Mukhejee SC, Pati S, Dutta RN, Chattejee G, Srivastava R, Chakraborti D. 2006. Arsenic groundwater contamination and its health effects in the state of Uttar Pradesh (UP) in upper and middle Ganga plain, India: A severe danger. *Sci Total Environ.* 370: 310-322.
- Ahmed F, Mabood Husain F, Ahmed I. 2011. *Microbe and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications.* chap14, Rhizosphere and Root Colonization by Bacterial Inoculants and Their Monitoring Methods: A Critical Area in PGPR Research, p.365-366. éd. New York Dordrecht Heidelberg London: Springer,.ISBN 978-1-4419-7930-8.
- Akhtar K, Akhtar MW, Khalid AM. 2007. Removal and recovery of uranium from aqueous solutions by *Trichoderma harzianum*. *Water Res.* 41(6): 1366–1378.
- Akiyama M. 1999. In vivo scavenging effect of ethylcysteine on reactive oxygen species in human semen. *Int J Urol.* 90: 421–428.
- Ali H, Khan E, Sajad MA. 2013. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere.* 91(7) : 869–881.
- Alloway BJ (ed.). 2013. *Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability.* Environmental Pollution 22.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot.* 53(372): 1331 1341.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Aly AH, Debbab A, Kjer J, Proksch P. 2010. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Divers.* 41: 1–16.
- An YJ, Kim M. 2009. Effect of antimony on the microbial growth and the activities of soil enzymes. *Chemosphere.* 74: 654–659
- Anand P, Isar J, Saran S, Saxena RK. 2006. Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Bioresour Technol.* 97:1018–1025.
- Ananda K, Sridhar KR. 2002. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west coast of India. *Can. J. Microbiol.* 48: 871–878.
- Anastasi A, Tigini V, Varese GC. 2013. The Bioremediation Potential of Different Ecophysiological Groups of Fungi. *Fungi as Bioremediators.* Soil Biology. 32: 29-49.
- Andrewes P, Cullen WR, Polishchuk E. 2000. Antimony biomethylation by *Scopulariopsis brevicaulis*: characterization of intermediates and the methyl donor. *Chemosphere.* 41:1717–1725.

- Angelova MB, Pashova SB, Spasova BK, Vassilev SV, Slokoska LS. 2005. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycol Res.* 109 (2):150–158.
- Ansari MI, Malik A. 2007. Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with wastewater. *Bioresour Technol.* 98: 3149–3153.
- Arias JA, Peralta-Videa J, Ellzey JT, Ren M, Viveros MN, Gardea-Toressdey JL. 2010. Effects of *Glomus deserticola* inoculation on *Prosopis*: Enhancing chromium and lead uptake and translocation as confirmed by X-ray mapping, ICP-OES and TEM techniques. *Environ Exper Bot.* 68: 139-148.
- Armstrong RC, Swallow AJ. 1969. Pulse- and gamma-radiolysis of aqueous solutions of tryptophan. *Radiat Res.* 40:563-579.
- Arnold AE, Maynard Z, Gilbert GS, Coley PD, Kursar TA. 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters.* 3: 267–274.
- Arnold AE. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges and frontiers. *Fungal Biol. Rev.* 21 : 51-66.
- Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase. A hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant.* 85: 235-241.
- Ayangbenro AS, Babalola O. 2017. A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. *Int J Environ Res Public Health.* 14-94.
- Azevedo M-M, Carvalho A, Pascoal C, Rodrigues F, Cássio F. 2007. Responses of antioxidant defenses to Cu and Zn stress in two aquatic fungi. *Sci Total Environ.* 377 (2-3) : 233–243.
- Baatout H, Combes D, Marrachi M. 1991. Reproductive system and population structure in two *Hedysarum* subspecies. I. Genetic variation within and between population. *Genome.* 34: 396-406.
- Baba AA. 2012. Etude de contamination et d'accumulation de quelques métaux lourds dans des céréales, des légumes et des sols agricoles irrigués par des eaux usées de la ville de Hammam Boughrara. Thèse de doctorat en chimie de l'environnement. Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen.
- Bai Z, Harvey LM, Mcneil B. 2003. Oxidative stress in submerged cultures of fungi. *Crit Rev Biotechnol.* 23: 267302.
- Bai Z, Harvey LM, McNeil B. 2003. Elevated temperature effects on the oxidant/antioxidant balance in submerged batch cultures of the filamentous fungus *Aspergillus niger* B1-D. *Biotechnol Bioeng.* 83: 772–779.
- Baker AJM, McGrath SP, Reeves RD, Smith JAC. 2000. Metal Hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biochemical resource for phytoremediation of metal polluted soil. - In: Terry, N., G. Baneulos (ed.): *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*: 85–107. Lewis Publications, Boca Raton.
- Baldrian P. 2003. Interaction of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme Microb Technol* 32: 78–91.
- Baptista P, Martins A, Pais MS, Tavares RM, Lino-Neto T. 2007. Involvement of reactive oxygen species during early stages of ectomycorrhiza establishment between *Castanea sativa* and *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza.* 17: 185–193.
- Baroja-Mazo A, Del Valle P, Ruá J, De Cima S, Busto F, De Arriaga D, Smirnoff N. 2005. Characterization and biosynthesis of D-erythroascorbic acid in *Phycomyces blakesleeanus*. *Fungal Genet Biol.* 42: 390–402.
- Benhamdi A, Bentellis A, Rached O, Du Laing G, Mechakra A. 2014. Effects of antimony and arsenic on antioxidant enzyme activities of two Steppic plant species in an old antimony mining area. *Biol Trace Elem Res.* 158:96–104.

- Benson DA, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. 2015. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 43(Database issue):D30–35.
- Bentellis A, Azzoug R, El Hadeff El Okki M, Rached O. 2014. Trace elements pollution from an abandoned mine and factors affecting Antimony concentrations in the Dahimine Wadi Bank soils (Northeast Algeria). *Carpath J Earth Env.* 9:95–106.
- Benteyl R, Chasteen TG. 2002. Microbial Methylation of Metalloids: Arsenic, Antimony and Bismuth: *Microbiology and Molecular biology.* ed. American Soc Microbiol. 66(2): 250-272.
- Bhar G, Samal AC, Santra SC. 2003. An investigation on arsenic removal by soil fungal isolates. *Sci & Cult.* 69(3): 157-158.
- Bienert GP, Møller ALB, Kristiansen K A, Schulz A, Møller IM, Schjoerring JK, Jahn TP. 2007. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem.* 282(2): 1183–1192.
- Beyersmann D, Hartwig A. 2008. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol.* 82: 493–512.
- Blais J, Djedidi Z, Cheikh RB, Tyagi R, Mercier G. 2008. Metals precipitation from effluents: Review. *Pract Period Hazard Toxic Radioact Waste Manag.* 12: 135–149.
- Bolton HJr, Fredrikson JK, Elliot LF. 1993. Soil Microbial Ecology: Application in Agricultural management. chap 2, *Microbial Ecology of the Rhizospher.* p. 36-37, 27-55. éd. Blaine F.
- Boton B, Breton M, Fevre S, Ghauthier PH, Larpent P, Reymond J-J, Sanglier Y, Vayssier P, Veau. 1990. *Moisissures Utiles et Nuisibles : Importance Industrielle : Collection Biotechnologies.* 2e ed. Paris, Milan, Barcelone, Mexico. Masson
- Branco MR, Marinho HS, Cyrne L, Antunes F. Decrease of H₂O₂ plasma membrane permeability during adaptation to H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 279 (8):6501–6506.
- Breuer U, Harms H. 2006. *Debaryomyces hansenii* –an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast.* 23(6): 415–437.
- Brot N, Weissbach H. 2000. Peptide methionine sulfoxide reductase: biochemistry and physiological role. *Biopolymers* 55: 288-296.
- Brundrett MC. 2006. Understanding the Roles of Multifunctional Mycorrhizal and Endophytic Fungi. In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN (eds). *Microbial Root Endophytes.* Soil Biology, vol 9. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Burford EP, Kierans M, Gadd GM. 2003. Geomycology: fungal growth in mineral substrata. *Mycologist.* 17: 98–107.
- Burford EP, Hillier S, Gadd GM. 2006. Biomineralization of fungal hyphae with calcite (CaCO₃) and calcium oxalate mono- and dihydrate in carboniferous limestone microcosms. *Geomicrobiol J.* 23: 599–611.
- Cabiscol E, Piulats E, Echave P, Herrero E, Ros J. 2000. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 275(35): 27393–27398.
- Canovas D, Duran C, Rodriquez N, Amils R, de Lorenzo V. 2003. Testing the limits of biological tolerance to arsenic in a fungus isolated from the River Tinto. *Environ Microbiol.* 5: 133–138.
- Carroll GC. 1986. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials, pp. 205–222. In Fokkema HJ, van den Heuvel J. (Eds.). *Microbiology of the Phylloplane.* Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Carroll GC. 1986. In: Andrews JA, Hirano SS. (Eds.). *Microbial Ecology of Leaves,* Springer-Verlag, New York (1991), pp. 358-375.

- Cavalcanti-Luna MA, Rodrigues-Vieira E, Okada K, Campos-Takaki GM, do-Nascimento AE. 2015. Copper induced adaptation, oxidative stress and its tolerance in *Aspergillus niger* UCP1261. *Electron J Biotechnol.* 18:418–427.
- Cernansky S, Urík M, Ševc J, Hiller E. 2007. Biosorption of arsenic and cadmium from aqueous solutions. *Afr J Biotechnol.* 6 (16): 1932-1934.
- Cernansky S, Urík M, Sevc J, Khun M. 2007. Biosorption and biovolatilization of arsenic by heat resistant fungi. *Environ Sci Pollut Res.* 14 : 31–35.
- Cervantes C, Campos-Garcia J, Devars S, Gutiérrez-Corona F, Loza-Tavera H, Torres-Guzmán JC, Moreno-Sánchez R. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microb Rev.* 25:335–47.
- Chakraborty S, Mukherjee A, Das TK. 2012. Biochemical characterization of a lead-tolerant strain of *Aspergillus foetidus*: an implication of bioremediation of lead from liquid media. *Int Biodeterior Biodegradation.* 84:134–142.
- Chakraborty S, Mukherjee A, Khuda-Bukhsh AR, Das TK. 2014. Cadmium-induced oxidative stress tolerance in cadmium resistant *Aspergillus foetidus*: its possible role in cadmium bioremediation. *Ecotoxicol Environ Safet.* 106: 46–53.
- Chan WK, Wildeboer D, Garelick H, Purchase D. 2014. Investigating Arsenic Resistance In Fungi From Tin-Mining Soils And The Possible Interaction Between Arsenic and Tin/Antimony. School of Science and Technology, Middlesex University. 10th International Mycological Congress Bangkok Thailand. August 3-8.
- Chance B, Machly AC. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol* 2:764–775.
- Chaney RL, Malik M, Li YM, Brown SL, Brewer EP, Angle JS, Baker AJM. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Curr Opin Biotech.* 8: 279–284.
- Chareprasert S, Piapukiew J, Thienhirun S, Whalley AJS, Sihanonth P. 2006. Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea saman* Merr. *World J Microbiol Biotechnol.* 22: 481–486.
- Chattopadhyay MK, Raghu G, Sharma YVRK, Biju AR, Rajasekharan MV, Shivaji S. 2011. Increase in oxidative stress at low temperature in an antarctic bacterium. *Curr Microbiol.* 62(2) :544-546.
- Chaverri P, Gazis R, Samuels G. 2011. *Trichoderma amazonicum*, a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. *Mycologia.* 103 (1): 139-151.
- Chelikani P, Fita I, Loewen PC. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci.* 61: 192–208.
- Chen C, Wang J. 2007. Influence of metal ionic characteristics on their biosorption capacity by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 74(4): 911–917.
- Chibuike G, Obiora S. 2014. Heavy metal polluted soils: Effect on plants and bioremediation methods. *Appl Environ Soil Sci.* 1–12.
- Christie P, Li XL, Chen BD. 2004. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. *Plant Soil.* 261: 209–217.
- Christine CC. 1997. Cd bioaccumulation in carp (*Cyprinus carpio*) tissues during long-term high exposure: analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Ecotoxicol Environ Saf.* 38: 137–143.
- Clay K, 1993. The ecology and evolution of endophytes. *Agr Ecosyst Environ.* 44: 39-64.
- Clay K, Schardl C. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *Am Nat.* 160 (4): S99-S127.
- Congeevaram S, Dhanarani S, Park J, Dexilin M, Thamaraiselvi K. 2007. Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. *J Hazard Mater.* 146:270–277.

- Costa IPMW, Maia LC, Cavalcanti MA. 2012. Diversity of leaf endophytic fungi in mangrove plants of northeast Brazil. *Braz J Microbiol.* 1165-1173.
- Csonka LN. 1981. Proline over-production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet.* 182: 82–86.
- Cyrne L, Martins L, Fernandes L, Marinho HS. 2003. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. *Free Radic Biol Med.* 34: 385–393
- DalCorso G. 2012 –Heavy metal toxicity in plants. In Furini A. – Plants and heavy metals. Springer, 86 P.
- Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 39:67–101.
- Davies KJA. 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life.* 50 (4-5): 279–289.
- Davis EC, Franklin JB, Shaw AJ, Vilgalys R. 2003. Endophytic Xylaria (Xylariaceae) among liverworts and angiosperms: phylogenetics, distribution, and symbiosis. *American J Botany.* 90: 1661–1667.
- Davis EC, Shaw AJ. 2008. Biogeographic and phylogenetic patterns in diversity of liverwort-associated endophytes. *American J Botany.* 95: 914–924.
- de Abreu CA, de Abreu MF, Andrade JC. 1998. Distribution of lead in the soil profil evaluated by DTPA and Mehlich-3 solution. *Bragantia.* 57, 185-882.
- de Bary A. 1866. Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten, und Myxomyceten . Vol. II. Hofmeister's Handbook of Physiological Botany. Leipzig, Germany .
- Delannoy E, Marmey P, Jalloul A, Etienne H, Nicole M. 2006. Molecular analysis of class III peroxidases from cotton. *J Cotton Sci.*10: 53–60.
- del Río LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gómez M, Barroso JB. 2002. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot.* 53 (372):1255-72.
- Del Val C, Barea JM, Azcon-Aguilar C. 1999. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy metal contaminated soils. *Appl Environ Microbiol.* 65(2): 718–723.
- Demers JE, Gugino BK, Jiménez-Gasco M. del M. 2014. Highly Diverse Endophytic and Soil *Fusarium oxysporum* Populations Associated with Field-Grown Tomato Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 81(1), 81–90.
- Demiral T, Türkan I. 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environ Exp Bot.* 53: 247-257.
- Deuneux- Mustin S, Debet SR, Mustin C, Henner P, Munier-Lamy C, Claude C, Berthelin J. 2003. *Mobilite Et Transfert Racinaire Des Elements En Traces : Influence Des Microorganismes Du Sol.* Chap2-3-4. P. 45-135. Ed. Paris : Lavoisier.
- Deng Z, Cao L, Huang H, Jiang X, Wang W, Shi Y, Zhang R. 2011. Characterization of Cd and Pb-resistant fungal endophyte *Mucor* sp. CBRF59 isolated from rapes (*Brassica chinensis*) in metal contaminated soils. *J Hazard Mater.* 185:717–724.
- Deng Z, Zhang R, Shi Y, Hu L, Tan H, Cao L. 2014. Characterization of Cd-, Pb-, Zn-resistant endophytic *Lasiodiplodia* sp. MXSF31 from metal accumulating *Portulaca oleracea* and its potential in promoting the growth of rape in metal-contaminated soils. *Environ Sci Pollut Res.* 21:2346–2357
- Dhankhar R, Hooda, A, 2011. Fungal biosorption – an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Environ Technol.* 32, 467–491.

- Dias M, Lacerda I, Pimentel P, De Castro H, Rosa C. 2002. Removal of heavy metals by an *Aspergillus terreus* strain immobilized in a polyurethane matrix. *Lett Appl Microbiol.* 34:46–50.
- Dixit R, Malaviya D, Pandiyan K, Singh UB, Sahu A, Shukla R, Singh BP, Rai JP, Sharma PK, Lade H. 2015. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability.* 7: 2189–2212.
- Djabeur A, Kaid-Harche M, Catesson AM. 2008. Structure des infrutescences et capacité fructifère de deux cytotypes de *Lygeum spartum* L. de l'ouest algérien *Ecologia mediterranea* – Vol. 34.
- Doolittle, W.F. 1998. You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. *Trends Genet.* 14, 307–311
- D'souza MA, Bhat DJ. 2013. Occurrence of microfungi as litter colonizers and endophytes in varied plant species from the Western Ghats forests, Goa, India. *Mycosphere.* 4 (3): 567-582.
- Du A, Cao L, Zhang R, Pan R. 2009. Effects of a copper-resistant fungus on copper adsorption and chemical forms in soils. *Water Air Soil Pollut.* 201: 99–107.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32:1792–1797.
- Egan MJ, Wang ZY, Jones MA, Smirnoff N, Talbot NJ. 2007. Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease. *Proc Natl Acad Sci. USA; PNAS.* 104: 11772–11777.
- Elahi A, Rehman A. 2018. Comparative behavior of two gram positive Cr6+ resistant bacterial strains *Bacillus aerius* S1 and *Brevibacterium iodinum* S2 under hexavalent chromium stress. *Biotechnol Rep.* e00307.
- Elahi A, Ajaz M, Rehman A, Vuilleumier S, Khan Z, Hussain SZ. 2019. Isolation, characterization, and multiple heavy metal-resistant and hexavalent chromium-reducing *Microbacterium testaceum* B-HS2 from tannery effluent. *J King Saud Univ Sci.* *in press*
- Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem.* 1: 529–539.
- Evans P, Halliwell B. 2001. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr.* 85: S67–S74
- Evans G, Evans J, Redman A, Johnson R, Foust N Jr. 2005. Unexpected beneficial effects of arsenic on corn roots grown in culture. *J Environ Chem.* 2(3): 167–170.
- Faeth SH, Gardner DR, Hayes CJ, Jani A, Wittlinger SK, Jones TA. 2006. Temporal and Spatial Variation in Alkaloid Levels in *Achnatherum robustum*, a Native Grass Infected with the Endophyte *Neotyphodium*. *J Chem Ecol* 32: 307.
- Fashola M, Ngole-Jeme V, Babalola O. 2016. Heavy metal pollution from gold mines: Environmental effects and bacterial strategies for resistance. *Int J Environ Res Public Health.* 13 (11): 1047.
- Fatoki OS. 1997. Biomethylation in the natural environment: A review: *S Afr J Sci.* 93(8): 366-368.
- Fazli MM, Soleimani N, Mehrasbi M, Darabian S, Mohammadi J, Ramazani A. 2015. Highly cadmium tolerant fungi: Their tolerance and removal potential. *J Environ Health Sci Eng.* 13(19):1–9.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* 39 :783-791
- Fernandes EG, Pereira OL, da Silva CC, Bento CPB, de Queiroz MV. 2015. Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. *Microbiol Res.* 181: 84–92.

- Filella, M, Belzile N, Chen YW. 2002. Antimony in the environment: a review focused on natural waters: I. Occurrence. *Earth-Sci Rev.* 57: 125–176.
- Fink SP, Reddy GR, Marnett LJ. 1997. Mutagenicity in *Escherichia coli* of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde. *Proc. Natl Acad Sci USA; PNAS.* 94(16): 8652–8657.
- Finkel T. 2000. Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* 476:52-54.
- Finnegan P, Chen W. 2012. Arsenic toxicity: The effects on plant metabolism. *Front Physiol.* 3: 182.
- Finzel BC, Poulos TL, Kraut J. 1984. Crystal structure of yeast cytochrome c peroxidase refined at 1.7-Å resolution. *J Biol Chem.* 259: 13027-13036.
- Firodiya A, Tenguria RK. 2013. Diversity of endophytic fungi in leaves of *Glycine Max* (L.) Merr. From central region of Madhya Pradesh. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2(6):5928-5934.
- Fisher PJ, Petrini O. 1987. Location of fungal endophytes in tissues of *Suaeda fruticosa*: a preliminary study. *Trans Brit Mycol Soc.* 89:246–249.
- Flemming HC, Wingender J. 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – part II: technical aspects. *Water Sci Technol.* 43: 9–16.
- Foyer C. 1993 -Antioxydatifs in higher plant of oxygene. *Planta.* 157-239.
- Fridovich I. 1998. Oxygen toxicity a radical explanation. *J Exp Biol.* 201: 1203–1209.
- Friedland AJ. 1990. Movement of metals through soils and ecosystems. In AJ Shaw (Ed.), *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects.* CRC Press: Boca Raton, Floride, USA.
- Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 64: 97–112.
- Fu F, Wang Q. 2011. Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. *J Environ Manage.* 92: 407–418.
- Fujs S, Gazdag Z, Poljsak B, Stibilj V, Milacic R, Pesti M, Raspor P, Batic M. 2005. The oxidative stress response of the yeast *Candida intermedia* to copper, zinc, and selenium exposure. *J Basic Microbiol.* 45: 125–135.
- Gadd GM. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.* 124: 25–60.
- Gadd GM. 1999. Fungal Production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. *Adv Microb Physiol.* 41: 47–92.
- Gadd GM. 2000a. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr Opin Biotechnol.* 11: 271–279.
- Gadd GM. 2000b. Heavy metal pollutants: environmental and biotechnological aspects. In: Lederberg, J. (ed.), *Encyclopedia of Microbiology.* Academic Press, New York, pp. 607–617.
- Gadd GM. 2001b. Metal transformations. In: Gadd, G. M. (ed.), *Fungi in Bioremediation.* Cambridge University Press, Cambridge, pp. 359–382.
- Gadd GM. 2001c. Accumulation and transformation of metals by microorganisms. In: Rehm HJ, Reed G, Puhler A, Stadler P. (eds.), *Biotechnology, a multi-volume comprehensive treatise, Vol. 10. Special processes.* Wiley-VCH Verlag, Weinheim, pp. 225–264.
- Gadd GM. 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology.* 156: 609–643.
- Gamboa MA, Bayman P. 2001. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). *Biotropica.* 33: 352–360.

- Garay-Arroyo A, Lledías F, Hansberg W, Covarrubias AA. 2003. Cu,Zn-superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to hyperosmosis. *FEBS Letters*. 539 (1–3) : 68-72.
- Garg N, Aggarwal N. 2012. Effect of mycorrhizal inoculations on heavy metal uptake and stress alleviation of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. Genotypes grown in cadmium and lead contaminated soils. *Plant Growth Regul.* 66(1): 9–26.
- Gavrilescu M. 2004. Removal of heavy metals from the environment by biosorption. *Eng Life Sci.* 4:219–232.
- Gebel T, Claussen K, Dunkelberg H. 1998. Human biomonitoring of antimony. *Int Arch Occ Env Hea.* 71: 221-224.
- Geiser D, Jimenez-Gasco M, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward T, Zhang N, Kuldau G. 2004. A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur J Plant Pathol.* Eur. J. Plant Pathol. 110: 473-479.
- Gharieb MM, Gadd GM. 1998. Evidence for the involvement of vacuolar activity in metal(loid) tolerance: vacuolar-lacking and -defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* display higher sensitivity to chromate, tellurite and selenite. *Biometals.* 11: 101–106.
- Giles SS, Stajich JE, Nichols C, Gerrald QD, Alspaugh JA, Dietrich F, Perfect JR. 2006. The *Cryptococcus neoformans* catalase gene family and its role in antioxidant defense. *Eukaryotic Cell.* 5: 1447–1459.
- Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem.* 48(12):909-30.
- Gohre V, Paszkowski U. 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta.* 223: 1115–1122.
- Gong LJ, Guo SX. 2009. Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. *Afr J Biotechnol.* 8: 731-736.
- González-Chávez MC, Carrillo-González R, Wright SF, Nichols KA. 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environ Pollut.* 130: 317–323.
- González-Teuber M, Vilo C, Bascuñán-Godoy L. 2017. Molecular characterization of endophytic fungi associated with the roots of *Chenopodium quinoa* inhabiting the Atacama Desert, Chile. *Genom Data.* 11: 109–112.
- Goudjil-Benhizia H. 2014. Caractérisation cytogénétique classique et moléculaire de trois espèces endémiques du genre *Hedysarum* L. Thèse de Doctorat en Sciences. Université des Frères Mentouri. Constantine1.
- Guelfi A, Azevedo RA, Lea PJ, Molina SMG. 2003. Growth inhibition of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* by cadmium: an antioxidant enzyme approach. *J Gen Appl Microbiol.* 49: 63–73.
- Guo LD. 2001. Advances of endophytic fungi. *Mycosystema* 20: 148–152. (in Chinese with English abstract).
- Gupta VK, Nayak A, Agarwal S. 2015. Bioadsorbents for remediation of heavy metals: Current status and their future prospects. *Environ Eng Res.* 20: 1–18.
- Hall JL. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot.* 53: 1–11.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 219: 1–14.
- Halliwell B, Aruoma OI. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters.* 281(1-2): 9–19.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. *Free radicals in biology and medicine*, 3rd ed. Oxford University Press Oxford.

- Han C, Liu Q, Yang Y. 2009. Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Picea asperata* seedlings. *Plant Growth Regul.* 58(2): 153–162.
- Han LR, Wang ZH, Zhang HJ, Xue LS, Feng JT, Zhang X. 2013. Isolation of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii* and their insecticidal activities. *Afr J Microbiol Res.* 7 (9): 771-776.
- Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel J, Ahmad A. 2012. Role of proline under changing environments. *Plant Signal Behav.* 7(11):1456-66.
- He M. 2007. Distribution and phytoavailability of antimony at an antimony mining and smelting area, Hunan, China. *Environ Geochem Health.* 29: 209-219.
- Hiner AN, Hernández-Ruiz J, Williams GA, Arnao MB, García-Cánovas F, Acosta M. 2001. Catalase-like oxygen production by horseradish peroxidase must predominantly be an enzyme-catalyzed reaction. *Arch Biochem Biophys.* 15;392(2):295-302.
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H. 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* 42(5):462-8.
- Hisada H, Hata Y, Kawato A, Abe Y, Akita O. 2005. Cloning and expression analysis of two catalase genes from *Aspergillus oryzae*. *J Biosci Bioeng.* 99: 562–568.
- Hoque MA, Banu MN, Okuma E, et al. 2007. Exogenous proline and glycine betaine increase NaCl-induced ascorbate-glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycine betaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension-cultured cells. *J Plant Physiol.* 164: 1457–1468.
- Hou W, Chen X, Song G, Wang Q, Chi Chang C. 2007. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiol Biochem.* 45(1):62-9.
- Houbraken J, Frisvad JC, Samson R. 2011. Taxonomy of *Penicillium* section Citrina. *Stud Mycol.* 70: 53–138.
- Howlett NG, Avery SV. 1997. Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Appl Environ Microbiol.* 63: 2971–2976.
- Huang WY, Cai YZ, Hyde KD, Corke H, Sun M. 2008. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional chinese medicinal plants. *Fungal Divers.* 33: 61-75.
- Huggins TG, Wells-Knecht MC, Detorie NA, Baynes, JW Thorpe SR. 1993. Formation of o-tyrosine and dityrosine in proteins during radiolytic and metal-catalyzed oxidation. *J Biol Chem.* 268:12341-12347.
- Hussein KA, Joo JH. 2013. Heavy metal resistance of bacteria and its impact on the production of antioxidant enzymes. *Afr J Microbiol Res.* 7(20) : 2288-2296.
- Huynh T D. *Impacts des métaux lourds sur l'interaction plante/ ver de terre/microflore tellurique.* Thèse de doctorat en écologie microbienne. 2009. Université Paris Est.
- Hyde KD, Soyong K. 2007. Understanding microfungus diversity a critique. *Cryptogamie Mycologie.* 28: 281-289.
- Hyde KD, Soyong K. 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers.* 33:163–173.
- Imlay JA, Linn S. 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science.* 240 (4857): 1302–1309.
- Imlay JA. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol.* 57:395–418.
- Impullitti AE, Malvick DK. 2013. Fungal endophyte diversity in soybean. *J Appl Microbiol.* 114(5): 1500–6.
- Inoue Y, Matsuda T, Sugiyama KI, Izawa S, Kimura A. 1999. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 274: 27002–27009.

- Iram S, Shabbir R, Zafar H, Javaid M. 2015. Biosorption and bioaccumulation of copper and lead by heavy metal resistant fungal isolates Arab. J Sci Eng. 40: 1867–1873.
- Islam MM, Hoque MA, Okuma E, Banu MN, Shimoishi Y, Nakamura Y, Murata Y. 2009. Exogenous proline and glycine betaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. J Plant Physiol. 166: 1587–1597.
- Islam R, Datta B. 2015. Influence of copper and zinc on siderophore production of *Fusarium* soil isolation. J Glob Biosci. 4(4): 1990-1995.
- Izawa S, Inoue Y, Kimura A. 1996. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem J 320: 61–67.
- Jacob C, Courbot M, Brun A, Steinman HM, Jacquot JP, Botton B, Chalot M. 2001. Molecular cloning, characterization and regulation by cadmium of a superoxide dismutase from the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. Eur J Biochem. 268: 3223-3232.
- Jadia C D, Fulekar M H. 2009. Phytoremediation of heavy metals: Recent techniques. Afr J Biotechnol. 8: 921–928.
- Jalgaonwala RE, Mohite BV, Mahajan RT. 2011. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi.
- Jana, Ulrike. Etude des interactions entre la plante *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh et le ver de terre *Aporrectodea caliginosa* (Savigny) : Application à la phytoremédiation de l'arsenic et de l'antimoine. 2009. Thèse Pour obtenir le grade de docteur de l'Université Paris Est Spécialité : Sciences de l'Univers et de l'Environnement.
- Jena SK, Tayung K, 2013. Endophytic fungal communities associated with two ethno-medicinal plants of similipal biosphere reserve, India and their antimicrobial prospective. J Appl Pharm Sci. 3 (4): 7-12.
- Joo JH, Hussein KA. 2012. Heavy metals tolerance of fungi isolated from contaminated soil. Korean J of Soil Sci Fert. 45(4): 565-571.
- Jumpponen A. 2001. Dark septate endophytes – are they mycorrhizal?. Mycorrhiza. 11:207–211.
- Kabata-Pendias A. 1992. Trace metals in soils in Poland – occurrence and behaviour. Soil Sci. 140: 53–70.
- Kaino T, Takagi H. 2008. Gene expression profiles and intracellular contents of stress protectants in *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol and sorbitol stresses. Appl Microbiol Biotech. 79: 273–283.
- Kaino T, Takagi H. 2009. Proline as a stress protectant in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: effects of trehalose and PRO1 gene expression on stress tolerance. Biosci Biotech Biochem. 73: 2131–2135.
- Kamal S, Prasad R, Varma A. 2010 *Soil Heavy Metals: Soil Biology*. chap3, *Soil Microbial Diversity in Relation to Heavy Metals*, p.31-32. ed. Heidelberg Dordrecht London New York: Springer,. ISBN: 978-3-642-02435.
- Kamiński P, Kurhalyuk N, Szady-Grad M. 2007. Heavy metal induced oxidative stress and changes in physiological process of free radicals in the blood of white stork (*Ciconia ciconia*) chicks in polluted areas. Polish J Environ Stud. 16(4): 555-562.
- Kapoor A, Viraraghavan T. 1995. Fungal biosorption an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. Bioresour Technol. 53: 195–206.
- Kassa-Laouar M, Mechakra A, Rodrigue A, Meghnous O, Bentellis A, Rached O. 2020. Antioxidative Enzyme responses to antimony stress of *Serratia marcescens* – an endophytic bacteria of *Hedysarum pallidum* roots. Pol J Environ Stud. 29(1): 1-12.

- Kaul S, Sharma SS, Mehta IK. 2008. Free radical scavenging potential of L-proline: evidence from in vitro assays. *Amino Acids*. 34: 315–320.7
- Kavamura VN, Esposito E. 2010. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnol Adv*. 28: 61-69.
- Kawasaki L, Aguirre J. 2001. Multiple Catalase Genes Are Differentially Regulated in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol*. 183(4): 1434–1440.
- Khalid A, Hussein, Jin Ho Joo. 2012. Comparison between Siderophores Production by Fungi Isolated from Heavy Metals Polluted and Rhizosphere Soils. *Korean J. Soil Sci. Fert*. 45(5) : 798-804
- Khan Abdul G. 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J Trace Elem Med Biol*. 18: 355–364.
- Khan R, Shahzad S, Choudhary MI, Khan SA, Ahmad A. 2007. Biodiversity of the endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* (AIT.) R. BR. *Pak J Bot*. 39 (6): 2233-2239.
- Khan AL, Hamayun M, Ahmad N, Hussain J, Kang SM, Kim YH, Adnan M, Tang DH, Waqas M, Radhakrishnan R, Hwang YH, Lee IJ. 2011a. Salinity stress resistance offered by endophytic fungal interaction between *Penicillium minioluteum* LHL09 and *Glycine max*. L. *J Microbiol Biotechnol*. 21: 893–902.
- Khan AL, Hamayun M, Kim YH, Kang SM, Lee IJ. 2011b. Ameliorative symbiosis of endophyte (*Penicillium funiculosum* LHL06) under salt stress elevated plant growth of *Glycine max* L. *Plant Physiol Biochem*. 49: 852–862.
- Khan A-R, Mahmood–Ul-Hassan M, Ahmad R, Munir A. 2018. Arsenic (Iii) Tolerance Potential Of Fungi Isolated From Polluted And Non-Polluted Soils Of Pakistan. *Pakistan J Agric Res*. 30 (1).
- Khouja HR. Identification par approches moléculaires de gènes impliqués dans la tolérance au stress oxydatif chez le champignon mycorhizien *Oidiodendron maius*. 2011. Thèse pour l'obtention du titre de Docteur en Biologie Végétale et Forestière. Ecole Doctorale Ressources, Procédés, Produits, Environnement. Université Henri Poincaré, Nancy 1 et Docteur en Biologie et Biotechnologie des Champignons. Ecole Doctorale des Sciences et Hautes Technologies. Université des Etudes de Turin.
- Kierans M, Staines AM, Bennet H, Gadd GM. 1991. Silver tolerance and accumulation in yeasts. *Biol Met*. 4: 100–106.
- Killian C. 1948. Contribution édaphiques et relations des plantes indicatrice de la région alfatière Algérienne. *Annales d'Agronomie*. 1 :4-27.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 16:111- 120
- Kitchin KT, Wallace K. 2008. The role of protein binding of trivalent arsenicals in arsenic carcinogenesis and toxicity. *J Inorg Biochem*. 102: 532–539.
- Koenig, H. 1995. Guide de mycologie médicale (Paris: Ellipses), 284 p. ISBN 2-7298-4512-7.
- Kosugi H, Kikugawa K. 1985. Thiobarbituric acid reaction of aldehydes and oxidized lipids in glacial acetic acid. *Lipids*. 20:915–920
- Koulman A, Lane GA, Christensen MJ, Fraser K, Tapper BA. 2007. Peramine and other fungal alkaloids are exuded in the guttation fluid of endophyte-infected grasses. *Phytochemistry*. 68 (3): 355-360.
- Krachler M, Emons H. 2000. Potential of high performance liquid chromatography coupled to low injection hydride generation atomic spectrometry for the speciation of inorganic and organic antimony compounds. *J Anal Atom Specrom*. 15: 281-285.
- Krachler M, Emons H, Zheng J. 2001. Speciation of antimony for 21st century: promises and pitfalls. *Trac Trend Anal Chem*. 20:79-90.

- Kreiner M, Harvey LM, McNeil B. 2002. Oxidative stress response of a recombinant *Aspergillus niger* to exogenous menadione and H₂O₂ addition. *Enzyme Microb Tech.* 30: 346–353.
- Krings M, Taylor TN, Hass H, Kerp H, Dotzler N, Hermsen EJ. 2007. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytol.* 174(3):648-57.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 33(7):1870-4.
- Kumar S, Kaushik N. 2013. Isolation, characterization and bioactivity of endophytic fungi from *Withania somnifera*. *Indian Phytopathol.* 66: 322–3.
- Krumova E.Z, Pashova S.B, Dolashka-Angelova P.A, Stefanova T, Angelova M.B. 2009. Biomarkers of oxidative stress in the fungal strain *Humicola lutea* under copper exposure. *Process Biochem.* 44: 288–295.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Cenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinform.* 23: 2947-2948.
- Lasat MM. 2002. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *J Environ Qual.* 31: 109–120.
- Lazarovaa N, Krumovab E, Stefanovac T, Georgievaa N, Angelova M. 2014. The oxidative stress response of the filamentous yeast *Trichosporon cutaneum* R57 to copper, cadmium and chromium exposure. *Biotechnol Biotec Eq.* 28 (5) : 855-862.
- Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ. 2013. Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol.* 11: 371–384.
- Leite TS, Cnossen-Fassoni A, Pereira OL, Mizubuti ESG, Araujo EF, Queiroz MV. 2013. Novel and highly diverse fungal endophytes in soybean revealed by the consortium of two different techniques. *J Microbiol.* 51: 56–69.
- Li Q, McNeil B, Harvey LM. 2008. Adaptive response to oxidative stress in the filamentous fungus *Aspergillus niger* B1-D. *Free Radical Bio Med.* 44: 394–402.
- Li P, Feng XB, Qiu GL, Shang LH, Li ZG. 2009. Mercury pollution in Asia: A review of the contaminated sites. *J Hazard Mater.* 168: 591-601.
- Li S, Zhang J, Li J, Chen D, Matteucci M, Curd J, Duan JX. 2009. Inhibition of both thioredoxin reductase and glutathione reductase may contribute to the anticancer mechanism of TH-302. *Biol Trace Elem Res.* 136: 294–301.
- Ling MO. 2013. *Screening of Mangrove Endophytic Fungi for Bioactive Compounds*. Masters of Science (by Research) at Swinburne University of Technology.
- Liu XF, Culotta VC. 1999. Mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Smf1p, a member of the Nramp family of metal transporters. *J Mol Biol.* 289: 885–891.
- Liu T, Staden JVan, Cress WA. 2000. Salinity induced nuclear and DNA degradation in meristematic cells of soybean (*Glycine max* (L.)) roots. *Plant Growth Regul.* 30(1): 49–54.
- Liu Y, Lam MC, Fang HHP. 2001. Adsorption of heavy metals by EPS of activated sludge. *Water Sci Technol.* 43: 59–66.
- Liu L, Bruhn T, Guo LD, Götz DCG, Brun BR, Stich A, Che YS, Bringmann G. 2011. Chloropupukeanolides C–E, cytotoxic pupukeanane chlorides with a spiroketal skeleton from *Pestalotiopsis fici*. *Chem Eur J.* 17: 2604–2613.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
- Luna C, Marcos A, Rodrigues Vieira E, Okada K, Campos-Takaki GM, do Nascimento AE. 2015. Copper induced adaptation, oxidative stress and its tolerance in *Aspergillus niger* UCP1261. *Electron. J Biotechnol.* 18:418–427.

- Ma Y, Li T, Ma C-c. 2015. A new pyrone derivative from an endophytic *Aspergillus tubingensis* of *Lycium ruthenicum*. Nat Prod Res. 30(13): 1499-503.
- Maciá-Vicente JG, Jansson HB, Abdullah SK, Descals E, Salinas J, Lopez-Llorca LV. 2008. Colonisation of barley roots by endophytic fungi and their reduction of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *trici*. Can J Microbiol. 64: 90-105.
- Mahdieh S, Hosseini-Moghaddam, Jalal S. 2014. Bioactivity of endophytic *Trichoderma* fungal species from the plant family Cupressaceae. Ann Microbiol 64: 753–761.
- Maheshwari R. 2006. What is an endophytic fungus? Curr Sci 90:1309
- Maheswari S, Murugesan A. 2009. Remediation of arsenic in soil by *Aspergillus nidulans* isolated from an arsenic-contaminated site. Environ Technol. 30: 921–926.
- Maheswari S, Murugesan AG. 2011. Removal of arsenic (III) from aqueous solutions using *Aspergillus flavus* isolated from arsenic contaminated sites. Ind J Chem Technol. 18: 45-52.
- Malik A. 2004. Metal bioremediation through growing cells. J Environ Int. 30: 261–278.
- Mangunwardoyo W, Suciati, Gandjar I. 2012. Frequency of endophytic fungi isolated from *Dendrobium crumenatum* (Pigeon orchid) and antimicrobial activity. Biodiversitas. 13 (1): 34-39.
- Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem. 47:469–474.
- Marquez SS, Bills GF, Zabalgogezcoa I, 2007. The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. Fungal Divers. 27: 171-195.
- Martino E, Turnau K, Giralda M, Bonfante P, Perotto S. 2001. Ericoid mycorrhizal fungi from heavy metal polluted soils: their identification and growth in the presence of zinc ions. Mycol Res. 104: 338–344.
- Martins D, English AM. 2014. Catalase activity is stimulated by H₂O₂ in rich culture medium and is required for H₂O₂ resistance and adaptation in yeast. Redox Biol. 2: 308–313.
- Matamoros MA, Dalton DA, Ramos J, Clemente MR, Rubio MC, Becana M. 2003. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. Plant Physiol, 133: 449-509.
- Matysik J, Alai Bhalu B, Mohanty P. 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. Current Sci. 82: 525–532.
- Meharena YT, Oertel P, Bhaskar B, Poulos TL. 2008. Engineering Ascorbate Peroxidase Activity into Cytochrome c Peroxidase. Biochem. 30; 47(39): 10324–10332.
- Meister A, Anderson ME. 1983. Glutathione. Annu Rev Biochem. 52: 711–760.
- Meriga B, Reddy BK, Rao KR, Reddy LA, Kishor PBK. 2004. Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). J Plant Physiol. 161(1): 63–68.
- Mika A, Minibayeva F, Beckett R, Lüthje S. 2004. Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. Phytochem Rev. 3(1): 173-193.
- Miller AF. 2004. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. Curr Opin Chem Biol. 8(2):162-8.
- Miquel G. 2001 *Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé : Office parlementaire d'Evaluation des choix scientifiques et technologiques*. p. 104 11e éd. Législative. N°261, Sénat session ordinaire de 2000-2001.
- Mishra S, Jha AB, Dubey RS. 2011. Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. Protoplasma. 248(3): 565–577.

- Mishra A, Gond SK, Kumar A, Sharma VK, Verma SK, Kharwar RN, Sieber TN. 2012. Season and tissue type affect fungal endophyte communities of the Indian medicinal plant *Tinospora cordifolia* more strongly than geographic location. *Microb Ecol.* 64:388–398.
- Mishra A, Malik A. 2013. Recent advances in microbial metal bioaccumulation. *Crit Rev Environ Sci Technol.* 43 : 1162–1222
- Mishra M, Chadha N, Kumar V, Prasad R, Varma A. 2014. Root endophytic fungi from two extreme geographical regions of India. *J Endocytobiosis Cell Res.* 25: 20-26.
- Molina L, Kahmann R. 2007. An *Ustilago maydis* gene involved in H₂O₂ detoxification is required for virulence. *Plant Cell.* 19: 2293–2309.
- Mosbah-Bentellis A. 2014. Etude écologique de la végétation des bordures d'un oued en région semi aride : cas de l'oued Dahimine (Wilaya de Oum El Bouaghi). Thèse de Doctorat en Sciences. Université des Frères Mentouri. Constantine1.
- Mubarak H, Chai LY, Mirza N, Yang ZH, Pervez A, Tariq M, Shaheen S, Mahmood Q. 2015. Antimony (Sb) - pollution and removal techniques –critical assessment of technologies. *Toxicol Environ Chem.* 97: 1–22.
- Mukherjee A, Das D, Mondal SK, Biswas R, Das TK, Boujedaini N, Khuda-Bukhsh AR. 2010. Tolerance of arsenate-induced stress in *Aspergillus niger*, a possible candidate for bioremediation. *Ecotoxicol Environ Saf.* 73:172–182.
- Mukherjee KK, Das D, Samal AC, Santra SC. 2013. Isolation and characterization of Arsenic tolerant fungal strains from contaminated sites around urban environment of Kolkata. *J Environ Sci, Toxicol Food Techn.* 7 (5): 33-37.
- Murciego AM, Sanchez AG, Gonzalez MAR, Gil EP, Gordillo CT, Fernandez JC, Triguero TB. 2007. Antimony distribution and mobility in top soils and plants (*Cytisus striatus*, *Cistus ladanifer* and *Dittrichia viscosa*) from polluted Sb-mining areas in Extremadura (Spain). *Environ Pollut.* 145: 15-21.
- Muzzamal H, Sarwar R, Sajid I, Hasnain S. 2012. Isolation, identification and screening of endophytic bacteria antagonistic to biofilm formers. *Pakistan J Zool.* 44: 249-257.
- Naeem A, Woertz JR, Fein JB. 2006. Experimental measurement of proton, Cd, Pb, Sr, and Zn adsorption onto the fungal species *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Sci Technol.* 40(18): 5724–5729.
- Nakano Y, Asada K. 1980. Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. *Plant Cell Physiol.* 21: 1295–1307.
- Navarro RE, Aguirre J. 1998. Posttranscriptional control mediates cell type-specific localization of catalase A during *Aspergillus nidulans* development. *J Bacteriol.* 180: 5733–5738.
- Nedeva TS, Petrova VY, Zamfirova DR, Stephanova EV, Kujumdzieva AV. 2004. Cu/Zn superoxide dismutase in yeast mitochondria—a general phenomenon. *FEMS Microbiol Lett.* 230: 19–25.
- Nei M. and Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT. 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *J Exper Bot.* 53: 1237–1247.
- Neill S, Desikan R, Hancock J. 2002. Hydrogen peroxide signaling. *Curr Opin Plant Biol.* 5(5): 388-95.
- Niklińska M, Chmiel, M. 1997. Comparison of Resistance to Heavy Metals of Soil Microorganisms of Regions Heavily Contaminated with Copper or Zinc. In: Barabasz, W. (ed.) *Microorganisms in the Environment. Entry Activity and Meaning*. Katedra Mikrobiologii Wydział Rolniczy Akademia Rolnicza im. Hugo Kołłątaja w Krakowie, Kraków, pp. 491-503 (in Polish).

- Neijssel OM, Buurman ET, Joost Teixeira de Mattos M. 1990. The role of futile cycles in the energetics of bacterial growth. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1018 : 252–255.
- Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson KH, Koljalg U. 2006. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PLoS One*. 1:e59.
- Noonim P, Mahakarnchanakul W, Varga J, Frisvad J C, Samson RA. 2008. Two novel species of *Aspergillus* section Nigri from Thai coffee beans. *Int J Syst Evol Microbiol*. 58: 1727–1734.
- O'Donnell K, Cigelnik E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol Phylogenet Evol*. 7: 103–16.
- Oladipo OG, Awotoye OO, Olayinka A, Ezeokoli OT, Maboeta MS, Bezuidenhout CC. 2016. Heavy metal tolerance potential of *Aspergillus* strains isolated from mining sites. *Bioremediat J*. 20(4): 287–297.
- Oliver MA. 1997. Soil and human health: a review. *Euro J Soil Sci*. 48: 573–592.
- Ortega-Larrocea MP, Siebe C, Estrada A, Webster R. 2007. Mycorrhizal inoculums potential of arbuscular mycorrhizal fungi in soils irrigated with wastewater for various lengths of time, as affected by heavy metals and available P. *Appl Soil Ecol*. 37: 129–138.
- Ozenda P. 1958. Flore du Sahara. Septentrionale et centrale. CNRS, ed. France, 286 p.
- Pathak S, Das J.K, Biswas S.J, Khuda-Bukhsh A.R. 2006. Protective potentials of a potentized homeopathic drug, Lycopodium-30, in ameliorating azo dye induced hepato carcinogenesis in mice. *Mol Cell Biochem* 258: 121–131.
- Pečiulytė D, Dirginčiūtė-Volodkienė V. 2012. Effect of zinc and copper on cultivable populations of soil fungi with special reference to entomopathogenic fungi. *Ekologija*. 58(2): 65-85.
- Penel C, Castillo FJ. 1991. Peroxidases of plant plasma membranes, apoplastic ascorbate, and relation of redox activities to plant pathology., CRC Press, Boca Raton, USA.
- Penninckx MJ, Elskens MT. 1993. Metabolism and functions of glutathione in microorganisms. *Adv Microb Physiol*. 34: 239–301.
- 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.
- Pimentel IC, Glienke-Blanco C, Gabardo J, Stuart RM, Azevedo JL. 2006. Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. *Braz Arch Biol Technol*. 49(5): 705–11.
- Pócsi I, Prade RA, Penninckx MJ. 2004. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv Microb Physiol*. 49:1–76
- Pócsi I, Miskei M, Karányi Z, Emri T, Ayoubi P, Pusztahelyi T, Balla G, Prade RA. 2005. Comparison of gene expression signatures of diamide, H₂O₂ and menadione exposed *Aspergillus nidulans* cultures – linking genome-wide transcriptional changes to cellular physiology *BMC Genomics*. 6:182
- Pokhrel D, Viraraghavan T. 2006. Arsenic removal from an aqueous solution by a modified fungal biomass. *Water Res*. 40(3): 549–552.
- Pryor B, Michailides T. 2002. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with alternaria late blight of pistachio. *Phytopathology*. 92: 406–16.
- Paulus B, Kanowski J, Gadek P, Hyde KD. 2006. Diversity and distribution of saprobic microfungi in leaf litter of an Australian tropical rainforest. *Mycol Res*. 110 : 1441-1454.

- Qasim BH. 2015. Détermination, spéciation et biodisponibilité des éléments traces métalliques dans les sols contaminés et technosols. Thèse de Doctorat. Université d'Orléans.
- Qayyum S, Khan I, Maqbool F, Zhao Y, Gu Q, Peng C. 2016. Isolation and characterization of heavy metal resistant fungal isolates from industrial soil in China. *Pak J Zool* 48:1241–1247.
- Quezel P, Santa S. 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CNRS. France. Tome I, pp: 539-541.
- Rached-Mosbah O, Gardou C. 1988. Soil-plant relationship in pastoral areas with a rich antimony substrate: example of Jebel Hamimat (Algeria). *Phytosociological Symposium XVI: Phytosociology and pastoralism*, Paris, 307.
- Rached-Mosbah, O., Gardou, C. et Pauwels, J. M., 1992. Accumulator plants in a steppe upon an antimonious contaminated soil. *Bulletin de la société botanique de France – Actualités botaniques*. 139 (1) : 133-139.
- Rached-Mosbah O, Gardou C, Dutuit P. 1997. Evolution d'une race tolérante à l'antimoine au sein des populations d'*Hedysarum pallidum* Desf., dans une région minière (Aïn Babouche, Algérie). *Rev Sci Technol*. 8 : 99-102.
- Radwan MA, El-Gendy KS, Gad AF. 2010. Biomarkers of oxidative stress in the land snail, *Theba pisana* for assessing ecotoxicological effects of urban metal pollution. *Chemosphere*. 79:40–46
- Raj S, Mohan S. 2016. Impact on proline content of *Jatropha curcas* in fly ash amended soil with respect to heavy metals. *J Pharm Pharm* 8: 244–247
- Raskin I, Ensley BD. 2000. *Phytoremediation of toxic metals; using plants to clean up the environment*. John Wiley and Sons, New York.
- Rathod LR, Pawar NB. 2013. In vitro seed treatment of fungicides for the control of seed borne fungi of soybean variety Durga. *Global Res Anal*. 2(10): 15–6.
- Reddy RA, Kumar B, Reddy PS, Mishra RN, Mahanty S, Kaul T, Nair S, Sopory SK, Reddy MK. 2009. Molecular cloning and characterization of genes encoding *Pennisetum glaucum* ascorbate-peroxidase and heat-stress responses. *J. Plant Physiol*. 166 :1646–1659.
- Redman RS, Dunigan DD, Rodríguez RJ. 2001. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytol*. 151 : 705-716.
- Reshma J, Linu M. 2017. Endophytic fungal assemblage in *Achyranthes aspera* Linn. revealed by internal transcribed spacer region of nuclear ribosomal RNA genes. *3 Biotech*. 7:109
- Rehner, S. A.; Buckley, E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*. 97: 84–98.
- Rensing C, Rosen B. 2009. Biogeochemical cycles for redox-active metal(oids): As, Cu, Mn and Se. In M. Schaechter (Ed.), *Encyclopedia of microbiology* (pp. 205–219). Oxford: Elsevier.
- Richter C. 1992. Reactive oxygen and DNA damage in mitochondria. *Mutat Res*. 275 (3-6): 249–255.
- Ridvan S. 2003. Biosorption of cadmium, lead, mercury and arsenic ions by the fungus *Penicillium purpurogenum*. *Sep Sci Technol*. 38(9): 2039-2053.
- Robards K, Worsfold P. 1991. Cd: toxicology and analysis – a review. *Analyst* 116: 549–568.
- Rodríguez RJ, Henson J, Van Volkenburgh E, Hoy M, Wright L, Beckwith F, Kim Y, Redman RS. 2008. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *Inter Soc Microb Ecol*. 2: 404– 416.
- Rodríguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, Redman RS. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New phytol*. 182: 314–330.

- Rose PK, Devi R. 2015. Adsorption isotherm study of cadmium on dairy sludge based adsorbent. *Int J Innov Res Sci Eng Technol*. 1:145–151.
- Rose PK, Devi, R. 2018. Heavy metal tolerance and adaptability assessment of indigenous filamentous fungi isolated from industrial wastewater and sludge samples. *Beni-Suef Univ J Basic App Sci*. 7 : 688–694.
- Rosen K, Zhong WL, Martensson A. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi mediated uptake of Cs-137 in leek and ryegrass. *Sci Total Environ*. 338: 283–290.
- Roy Kw, Baird Re, Abney TS. 2000. A review of soybean (*Glycine max*) seed, pod, and flower mycofloras in North America, with methods and key for identification of selected fungi. *Mycopathology*. 150: 15–27.
- Sadiq M. 1997. Arsenic chemistry in soils: An overview of thermodynamic predictions and field observations. *Water Air Soil Pollut*. 93(1–4): 117–136 in Cernanskys et al., 2007.
- Safahieh A, Abyar H, Roostan Z, Zolgharnein H, Mojoodi F. 2014. Isolation and characterization of *Pseudomonas* resistant to heavy metals and poly aromatics hydrocarbons (PAHs) from Persian Gulf sediments. *Afr J Biotechnol*. 11:4418–4423.
- Saikkonen K, Saari S, Helander M. 2010. Defensive mutualism between plants and endophytic fungi? *Fungal Divers*. 41: 101–113.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 4 :406-425.
- Salt DE, Smith RD, Raskin I. 1998. Phytoremediation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 49: 643–668.
- Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CH, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol*. 78: 141–173.
- Schliebs W, Wurtz C, Kunau WH, Veenhuis M, Rottensteiner H. 2006. A eukaryote without catalase-containing microbodies: *Neurospora crassa* exhibits a unique cellular distribution of its four catalases. *Eukaryotic Cell*. 5: 1490–1502.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W. 2012. Fungal barcoding consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109(16): 6241–6.
- Schubert K, Groenewald J, Braun U, Dijksterhuis J, Starink M, Hill C, Zalar P, de Hoog G, Crous P. 2007. Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (Davidiellaceae, Capnodiales), with standardization of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Stud Mycol*. 58: 105–156.
- Schuller DJ, Ban N, Huystee RB, McPherson A, Poulos TL. 1996. The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure*. 4: 311-321.
- Schützendübel A, Polle A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exper Bot*. 53: 1351–1365.
- Seena S, Sridhar KR. 2004. Endophytic fungal diversity of 2 sand dune wild legumes from the southwest coast of India. *Can J Microbiol*, 50: 1015-1021.
- Sénéquier-Crozet A, Canard B. 2016. Les champignons endophytes : impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutique. *Sciences pharmaceutiques*. ffdumas01266084f
- Sharma P, Dubey RS. 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regul*. 46(3): 209–221.
- Sharma SS, Dietz KJ. 2006. The significance of amino acids and amino acid- derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J Exp Bot*. 57: 711–726.

- Sharma R, Kumar BSV. 2013. Isolation characterization and antioxidant potential of endophytic fungi of *Ocimum sanctum* Linn. (Lamiaceae). *Indian J Appl Res.* 3(7): 5-10.
- Shi Y, Zhang X, Lou K. 2013. Isolation, characterization, and insecticidal activity of an endophyte of drunken horse grass, *Achnatherum inebrians*. *J Insect Sci.* 13 (5): 1-12.
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabouta Y, Yoshimura K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot.* 53: 1305-1319.
- Shin MN, Shim J, You Y, Myung H, Bang KS, Cho M, Kamala-Kannan S, Oha BT. 2012. Characterization of lead resistant endophytic *Bacillus* sp. MN3-4 and its potential for promoting lead accumulation in metal hyperaccumulator *Alnus firma*. *J Hazard Mater.* 199– 200: 314– 320.
- Sieber TN. 2007. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists?. *Fungal Biol. Rev.* 21: 75–89
- Singh SK. 2013. Endophytic fungi from *Jatropha curcus*: A preliminary study. *J Pharm Innov.* 2 (2): 26-29.
- Singh M, Srivastava PK, Verma PC, Kharwar RN, Singh N, Tripathi RD. 2015. Soil fungi for mycoremediation of arsenic pollution in agriculture soils. *J App Microbiol.* 119 : 1278-1290.
- Siripornadulsil S, Traina S, Verma DPS, Sayre RT. 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell* 14: 2837–2847.
- Skouboe P, Frisvad J, Taylor J, Lauritsen D, Boysen M, Rossen L. 1999. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. *Mycol Res.* 103:873–81. 31.
- Skoneczny M, Rytka J. 2000. Oxygen and haem regulate the synthesis of peroxisomal proteins: catalase A, acyl-CoA oxidase and Pex1p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; the regulation of these proteins by oxygen is not mediated by haem. *Biochem J.* 350: 313–319.
- Šmejkalová M, Mikanová O, Borůvka L. 2003. Effects of heavy metal concentrations on biological activity of soil micro-organisms. *Plant Soil Environ.* 49: 321–326.
- Smirnoff N, Cumbes QJ. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochem.* 28: 1057–1060.
- Smirnoff N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and dessication. *New Phytol.* 125: 27–58.
- Smirnoff N. 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment, in *Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation*, N. Smirnoff, Ed., pp. 217–243, Bios Scientific Publishers, Oxford, UK.
- Smith SE, Read DJ. 1997. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. London.
- Smolders E, Brans K, Foldi A, Merckx R. 1999. Cadmium fixation in soils measured by isotopic dilution. *Soil Sci Soc Am J.* 63(1), 78–85.
- Srivastava PK, Vaish A, Dwivedi S, Chakrabarty D, Singh N, Tripathi R D. 2011. Biological removal of arsenic pollution by soil fungi. *Sci Total Environ.* 409(12):2430-42.
- Staniek A, Woerdenbag HJ, Kayser O. 2008. Endophytes: exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. *J. Plant Interact.* 3(2) : 75-93
- Stephen DW, Jamieson DJ. 1996. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett.* 141: 207–212.
- Sterckeman T, Douay F, Proix N, Fourrier H. 2000. Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environ Pollut.* 107, 377-389.
- Sterflinger K. 2000. Fungi as geologic agents. *Geomicrobiol J.* 17: 97–124.

- Stielow J, Levesque C, Seifert K, Meyer W, Irinyi L, Smits D, Renfurm R, Verkley Groenewald G, Chaduli M. 2015. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia. Mol Phylogenet Evol Fungal.* 35: 242–263.
- Stohs SJ, Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Bio Med.* 18: 321–336.
- Stone JK, Polishook JD, White JRJ. 2004. Endophytic fungi. In: Mueller G, Bills GF, Foster MS. (Eds). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods.* Burlington, MA, USA: Elsevier, 241-270.
- Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC. 2001. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the inter-membrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem.* 276: 38084–38089.
- Suciatmih, Rahmansyah M., 2013. Endophytic fungi isolated from mangrove plant and have antagonism role against *Fusarium wilt*. *ARNP J Agric Biol Sci.* 8 (3): 251-257.
- Sun X, Guo LD, 2012. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. *Mycology.* 3 (1): 65-76.
- Susca A, Stea G, Mulé G, Perrone G. 2007. PCR identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on calmodulin gene. *Food Addit Contam.* 24 (10): 1154-1160.
- Szabados L, Savoure A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15: 89–97.
- Takagi H, Taguchi J, Kaino T. 2016. Proline accumulation protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase from ethanol stress by reducing reactive oxygen species levels. *Yeast.* 33: 355–363.
- Takasuka T, Sayers NM, Anderson MJ, Benbow EW, Denning DW. 1999. *Aspergillus fumigatus* catalases: cloning of an *Aspergillus nidulans* catalase B homologue and evidence for at least three catalases. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 23: 125–133.
- Takemoto D, Tanaka A, Scott B. 2007. NADPH oxidases in fungi: diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation. *Fungal Genet Biol.* 44: 1065–1076.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725–2729.
- Tan XM, Chen XM, Wang CL, Jin XH, Cui JL, Chen J, Guo SX, Zhao LF. 2012. Isolation and Identification of Endophytic Fungi in Roots of Nine *Holcoglossum* Plants (Orchidaceae) Collected from Yunnan, Guangxi, and Hainan Provinces of China. *Curr Microbiol.* 64: 140–147.
- Tanaka A, Christensen MJ, Takemoto D, Park P, Scott B. 2006. Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus–perennial ryegrass mutualistic interaction. *Plant Cell.* 18: 1052–1066.
- Tanou G, Molassiotis A, Diamantidis G. 2009. Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity. *Environmental and Exper Bot.* 65(2-3): 270–281.
- Teng Y, Du X, Wang T, Mi C, Yu H, Zou L. 2018. Isolation of a fungus *Penicillium sp.* with zinc tolerance and its mechanism *Biologia of resistance.* *Arch Microbiol.* 200:159–169
- Tejesvi MV, Mahesh B, Nalini MS, Prakash HS, Kini KR, SubbiahV, Shetty HS. 2006. Fungal endophyte assemblages from ethnopharmacologically important medicinal trees. *Can. J. Microbiol.* 52: 427-435.
- Tejesvi MV, Kajula M, Mattila S, Pirttilä AM. 2011. Bioactivity and genetic diversity of endophytic fungi in *Rhododendron tomentosum* Harmaja. *Fungal Divers.* 47: 97–107.

- Thomas D, Klein K, Manavathu E, Dimmock JR, Mutus B. 1991. Glutathione levels during thermal induction of the yeast-to-mycelial transition in *Candida albicans*. FEMS Microbiol Lett. 77: 331–334.
- Tkaczuk C, Majchrowska-Safaryan A, Panasiuk T, Tipping C. 2019. Effect of selected heavy metal ions on the growth of entomopathogenic fungi from the genus *Isaria*. Appl Ecol Env Res. 17(2):2571-2582.
- Torres MA, Dangl JL, Jones JD. 2002. Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. Proc Natl Acad Sci U S A. 99(1): 517-522.
- Trevors JT, Stratton GW, Gaad GM. 1986. Cadmium transport, resistance and toxicity in algae, bacteria and fungi. Canadian J Microbiol. 32: 447-456.
- Troll W, Luidsley J. 1955. A photometric method for determination of proline. J Biol chem.. 215(2):655-660.
- Tsekova K, Ianis M, Dencheva V, Ganeva S. 2007. Biosorption of binary mixtures of copper and cobalt by *Penicillium brevicompactum*. Z. Naturforsch. [C]. 62(3–4): 261–264.
- Tsikis D. 2017. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges. Anal Biochem. 524:13–30.
- Todorova D, Nedeva D, Abrashev R, Tsekova K. 2008. Cd (II) stress response during the growth of *Aspergillus niger* B 77. J App Microbiol. 104: 178–184.
- Tullio M, Pierandrei F, Salerno A, Rea E. 2003. Tolerance to cadmium of vesicular arbuscular mycorrhizae spores isolated from a cadmium-polluted and unpolluted soil. Biol Fert Soils. 37: 211–214
- Turrens JF. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol. 552: 335–344.
- Uthus E. 1992. Evidence for arsenic essentiality. Environ Geochem Health. 14(2), 55–58.
- Vala AK. 2010. Tolerance and removal of arsenic by a facultative marine fungus *Aspergillus candidus*. Bioresour Technol. 101(7): 2565-7.
- Vala AK, Sutariya V. 2012. Trivalent arsenic tolerance and accumulation in two facultative marine fungi. Jund J Microbiol. 5: 542–545.
- Van der Lelie D, Schwitzguebel JP, Glass DJ, Vangronsveld J, Baker. A. 2001. Assessing phytoremediation's progress in the United States and Europe. Environ Sci Technol. 35: 446A–452A.
- Velikova V, Yordanov I, Edreva AB. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. Plant Sci. 151: 59-66.
- Vianello A, Zancani M, Nagy G, Macri F. 1997. Guaiacol peroxidase associated to soybean root plasma membranes oxidizes ascorbate. J Plant Physiol. 150: 573- 577.
- Vido K, Spector D, Lagniel G, Lopez S, Toledano MB, Labarre J. 2001. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 276 : 8469–8474.
- Vijver MG, Gestel CAMV, Lanno RP, Van Straalen NM, Peijnenburg WJGM. 2004. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: a review. Environ Sci Technol. 38: 4705–4712.
- Visagie C, Houbraken J, Frisvad JC, Hong SB, Klaassen C, Perrone G, Seifert K, Varga J, Yaguchi T, Samson R. 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. Stud Mycol. 78:343–371.
- Vogt W. 1995. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. Free Radic Biol Med. 18:93-105.

- Volesky B, May-Phillips HA. 1995. Bisorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42: 797–806.
- Wada N, Kinoshita S, Matsuo M, Amako K, Miyake C, Asada K. 1998. Purification and molecular properties of ascorbate peroxidase from bovine eye. Biochem biophys res commun. 242: 256–261.
- Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Hückelhoven R, Neumann C, Von Wettstein D, Franken P, Kogel KH. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. PNAS USA. 102 : 13386-13391.
- Wang F, Zeng B, Sun Z, Zhu C. 2009. Relationship between proline and Hg²⁺-induced oxidative stress in a tolerant rice mutant. Arch Environ Contam Toxicol. 56: 723–731.
- Wang J, Chen C. 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. Biotechnol Adv. 27:195–226.
- Wang Q, He M, Wang Y. 2010. Influence of combined pollution of antimony and arsenic on culturable soil microbial populations and enzyme activities. Ecotoxicology. 20(1): 9–19.
- Welinder KG. Superfamily of plant, fungal, and bacterial peroxidases. Curr Opin Struct Biol 1992;2:388–393.
- Wenzel W, Kirchbaumer N, Prohaska T, Stingeder G, Lombi E, Adriano D. 2001. Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure. Anal. Chim. Acta. 436(2): 309–323.
- White C, Sayer JA, Gadd GM. 1997. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. FEMS Microbiol Rev. 20: 503–516.
- Wilson D. 1995. Endophyte - The evolution of a term, and clarification of its use and definition. Oikos. 73:274-276.
- Winyard PG, Moody CJ, Jacob C. 2005. Oxidative activation of antioxidant defence. Trends Biochem Sci. 30: 453–61.
- Wood ZA, Schröder E, Harris JR, Poole LB. 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. Trends Biochem Sci. 28: 32–40.
- Wysocki R, Tamás MJ. 2010. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. FEMS Microbiol Rev. 34: 925–951.
- Xiao X, Luo S, Zeng G, Wei W, Wan Y, Chen L, Guo H, Cao Z, Yang L, Chen J, Xi Q. 2010. Bisorption of cadmium by endophytic fungus (EF) *Microsphaeropsis sp.* LSE10 isolated from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L., Bioresour Technol. 101: 1668–1674.
- Xie Y, Fan J, Zhu W, Amombo E, Lou Y, Chen L, Fu J. 2016. Effect of heavy metals pollution on soil microbial diversity and bermudagrass genetic variation. Front Plant Sci. 31(7): 775.
- Xu J, Ebada SS, Proksch P. 2010. Pestalotiopsis a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. Fungal Divers. 44: 15–31.
- Yamauchi Y, Furutera A, Seki K, Toyoda Y, Tanaka K, Sugimoto Y. 2008. Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants. Plant Physiol Biochem. 46(8-9): 786–793.
- Yan G, Viraraghavan T. 2003. Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. Water Res. 37: 4486–4496.
- Yan J, Tsuichihara N, Etoh T, Iwai S. 2007. Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in ABA inhibition of stomatal opening. Plant Cell Environ. 30(10):1320-1325.

- Yang SL, Lan SS, Gong M. 2009. Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. *J Plant Physiol.* 166: 1694–1699.
- You Y-H, Park J M, Lim S H, Kang S-M, Park J-H, Lee I-J, Kim J-G. 2016. Gibberellin A7 production by *Aspergillus tubingensis* YH103 and cultural characteristics of endophytic fungi isolated from *Tetragonia tetragonoides* in Dokdo islands. *Korean J Microbiol.* 52(1): 32-39.
- Yuan, S. Guo JH, Du JB, Lin HH. 2008. Phylogenetic analyses of plastid-originated proteins imply universal endosymbiosis in ancestors of animals and fungi. *Z Naturforsch C J Biosci.* 63: 903–908.
- Zafar S, Aqil F, Ahmad I. 2007. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresour Technol.* 98: 2557–2561.
- Zámocký M, Jakopitsch C, Furtmüller PG, Dunand C, Obinger C. 2008. The peroxidase–cyclooxygenase superfamily: reconstructed evolution of critical enzymes of the innate immune system. *Proteins.* 72:589–605.
- Zámocký M, Furtmüller PG, Obinger C. 2010. Evolution of structure and function of Class I peroxidases. *Arch Biochem Biophys.* 500: 45–57.
- Zámocký M, Gasselhuber B, Furtmüller PG, Obinger C. 2014. Turning points in the evolution of peroxidase–catalase superfamily: molecular phylogeny of hybrid heme peroxidases. *Cell Mol Life Sci.* 71(23):4681-96.
- Zámocký M, Janeček Š, Obinger C. 2017. Fungal Hybrid B heme peroxidases – unique fusions of a heme peroxidase domain with a carbohydrate-binding domain. *Sci Rep.* 7 : 9393.
- Zeng XX, Chai LY, Tang JX, Liu XD, Yang ZH. 2013. Taxonomy characterization and cadmium biosorption of fungus strain. *Trans Nonferrous Met Soc China.* 23 2759–2765.
- Zhang FQ, Wang YS, Lou ZP, Dong JD. 2007. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandeliacandel* and *Bruguieragymnorrhiza*). *Chemosphere.* 67:44–50.
- Zhang JH, Min H. 2009. Characterization of a multimetal resistant *Burkholderia fungorum* isolated from an e-waste recycling area for its potential in Cd sequestration. *World J Microbiol Biotechnol.* 26: 371-374.
- Zouari M, Ben Ahmed C, Zorrig W, Elloumi N, Rabhi M, Delmail D, Ben Rouina B, Labrousse P, Ben Abdallah F. 2016. Exogenous proline mediates alleviation of cadmium stress by promoting photosynthetic activity, water status and antioxidative enzymes activities of young date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Ecotox Environ Safe.* 128:100–108.

Annexes

Annexe 1 : Les milieux de cultures

1. Milieux d'isolement et d'identification : PDA (Potato dextrose agar)

Pomme de terre.....	200g
Glucose.....	15g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

pH= 6

2. Milieux de screening et fermentation : Sabouraud tamponné :

Glucose.....	20g
Peptone.....	10g
Tampon citrate 50 mM	1000ml

pH= 6,4

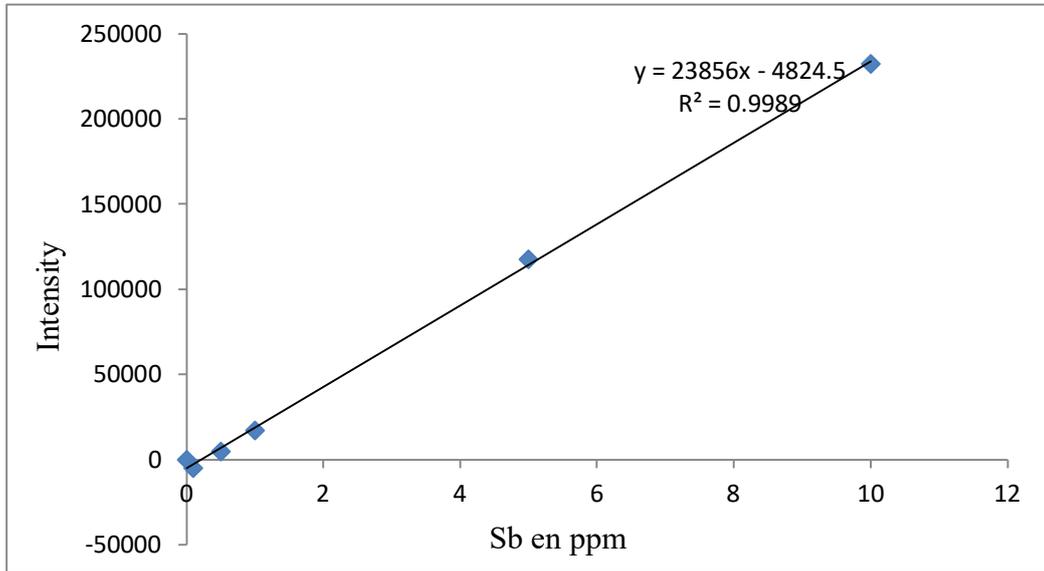
Annexe 2 : Extraction d'ADN génomique des mycoendophytes Résistants

L'extraction d'ADN se fait selon le protocole propose par le fournisseur (Promega): *Wizard Genomic DNA Purification kit* :

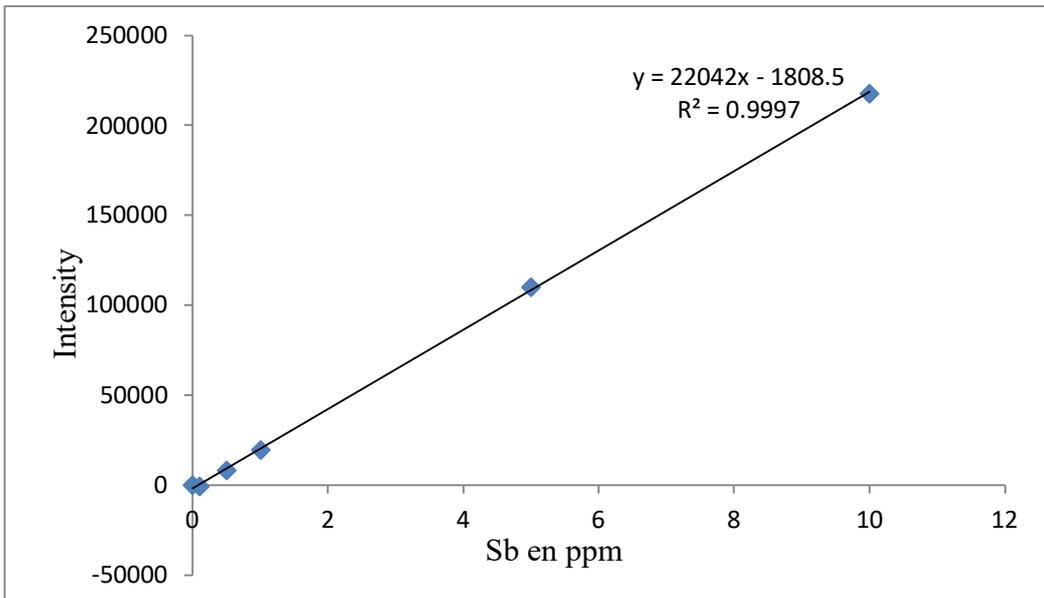
1. La biomasse congelée est mise dans des mortiers en porcelaine stériles, est broyée dans l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre fine.
2. 40 mg de la poudre du mycelium est mise dans des tubes eppendorfs.
3. Ajouter 600µl de Nuclei Lysis Solution, et vortexez 1-3 secondes.
4. Incubez à 65°C pendant 15 minutes.
5. Ajoutez 3µl de RNase Solution pour les lysats cellulaires, pour mélanger les échantillons par l'inversion des tubes 2-5 fois, puis incubez une autre fois à 37 °C pendant 15 minutes. Laisser les échantillons dans une température ambiante pendant 5 minutes avant de procéder.
6. Ajoutez 200µl de Protein Precipitation Solution, et vortexer vigoureusement pendant 20 secondes.
7. Centrifuger pendant 3 minutes à 13,000 –16,000 × g, les protéines forment un précipité.
8. Eliminer délicatement le supernageant contenant l'ADN et le transférer dans de nouveaux tubes eppendorfs de 1,5 ml contenant 600 µl isopropanol.
9. Mélanger doucement par inversion de la solution, puis centrifuger à 13,000 –16,000 × g pendant 1 minute à température ambiante.
10. Décanter délicatement le supernageant, et ajoutez 600 µl éthanol à 70% pour rincer l'ADN, puis centrifuger pendant 1 minute à 13,000 –16,000 × g.
11. Aspirer délicatement l'éthanol, en utilisant une pipette Pasteur.
12. Laisser le culot sécher pendant 15 minutes sur du papier absorbent propre.
13. Ajouter 100 µl de DNA Rehydration Solution, pour réhydrater l'ADN par incubation toute une nuit à 4°C.
14. Conserver l'ADN à -20°C.

Annexe 3 : Courbes étalons

1. Courbes d'étalonnage de Sb

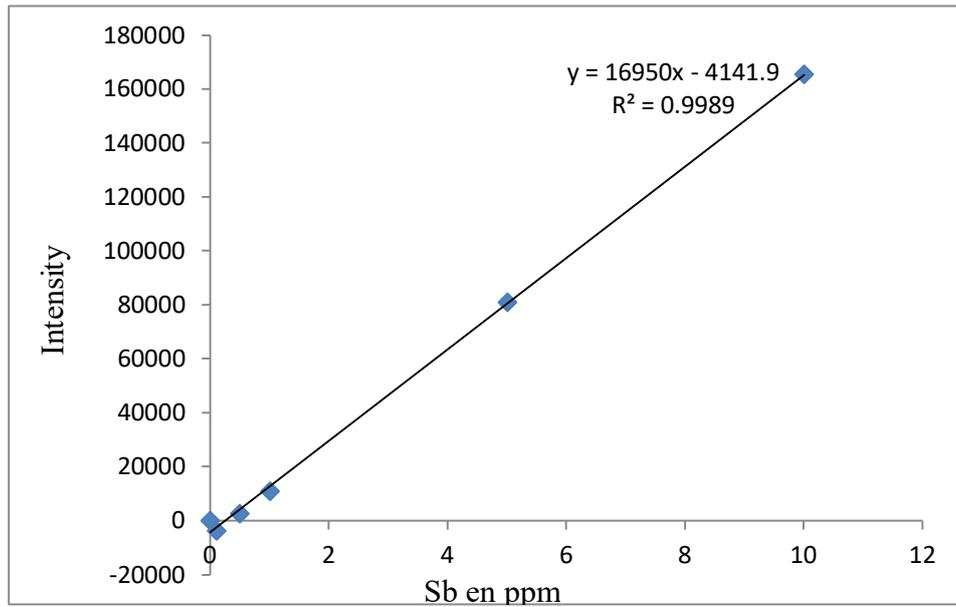


La courbe d'étalonnage de l'antimoine à la longueur d'onde 217,581 avec prétraitement

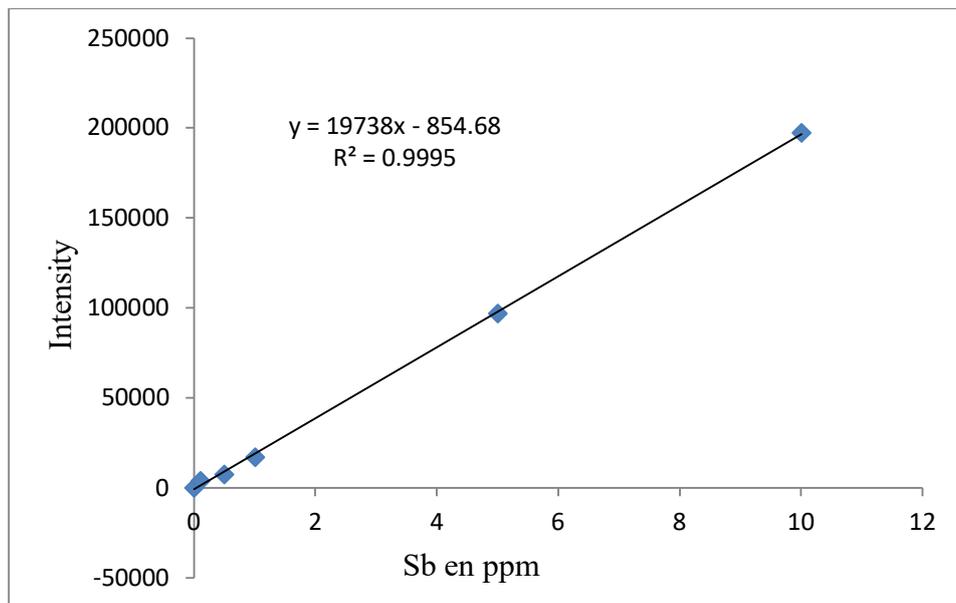


La courbe d'étalonnage de l'antimoine à la longueur d'onde 231,147 avec prétraitement

Annexes

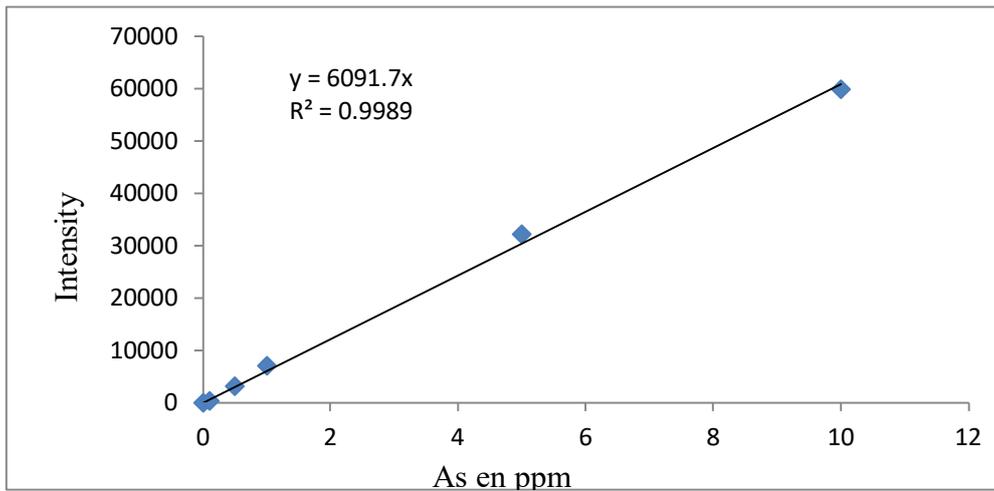


La courbe d'étalonnage de l'antimoine à la longueur d'onde 217,581 sans prétraitement

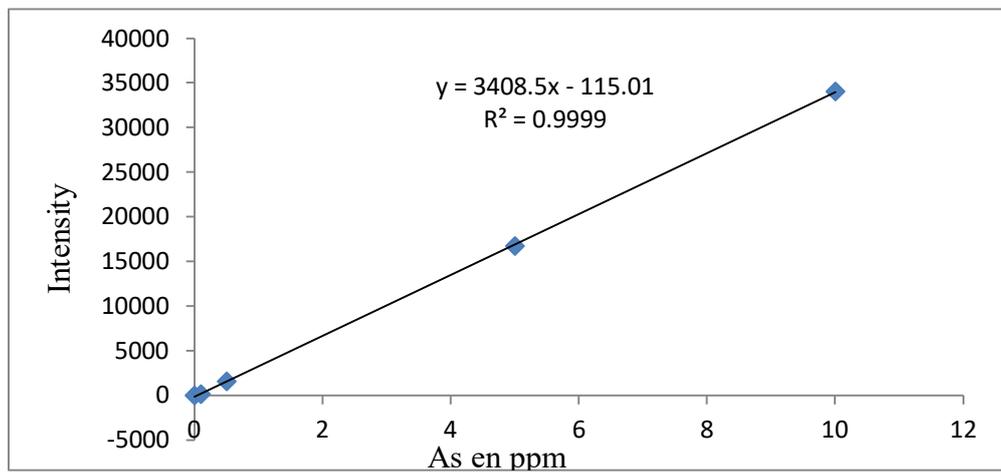


La courbe d'étalonnage de l'antimoine à la longueur d'onde 231,147 sans prétraitement

2. Courbes d'étalonnages de As :

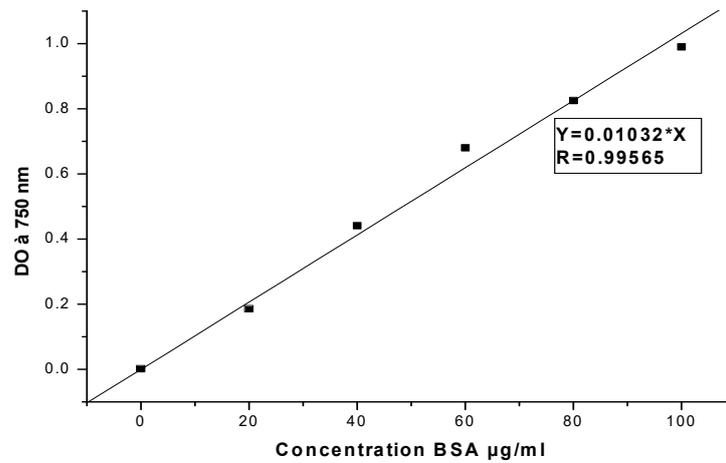


La courbe d'étalonnage de l'arsenic avec prétraitement



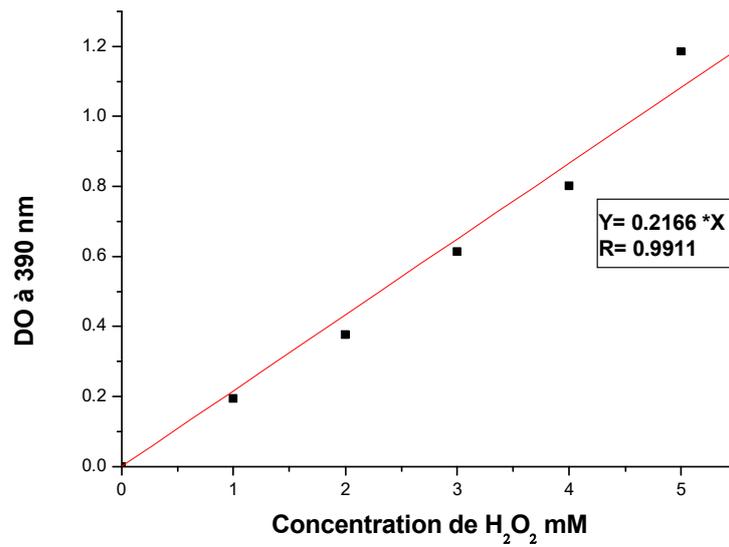
La courbe d'étalonnage de l'arsenic sans prétraitement

3. Courbe d'étalonnage de BSA :



Courbe d'étalonnage de BSA

4. Courbe d'étalonnage de H_2O_2 :



Courbe d'étalonnage de H_2O_2

Annexe 4 : Matrices de corrélation

Tableau 15 : Matrice de corrélation de *Pearson* entre toutes les variables analysées et les concentrations d'As dans le milieu de culture pour *A. tubingensis*

Variables	Poids sec	H ₂ O ₂	MDA	Proline	CAT	SOD	POD	APX
As mM	-0,8518***	0,8710***	0,9826***	0,7419**	0,9199***	0,3418	0,8780***	-0,9410***
Poids sec	1	-0,7828**	-0,8748***	-0,8117**	-0,8224**	-0,2638	-0,8145**	0,7465**
H ₂ O ₂		1	0,8761***	0,7611**	0,8544***	0,5486	0,8483***	-0,8221**
MDA			1	0,7287**	0,9720***	0,3949	0,9433***	-0,8734***
Proline				1	0,6882*	0,4821	0,6821*	-0,7515**
CAT					1	0,5047	0,9806***	-0,7650**
SOD						1	0,6043*	-0,3636
POD							1	-0,7367**

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$

* $p < 0.05$; ** $p < 10^{-2}$, *** $p < 10^{-3}$ ($n = 12$)

Tableau 16 : Matrice de corrélation de *Pearson* entre toutes les variables analysées et les concentrations de Sb dans le milieu de culture pour *F. oxysporum*

Variables	Poids sec	H ₂ O ₂	MDA	Proline	CAT	SOD	POD	APX
Sb mM	-0,2630	0,9847***	0,9183***	0,8823**	0,8503**	0,9798***	0,9928***	0,9867***
Poids sec	1	-0,2859	-0,1422	-0,4756	0,1643	-0,2342	-0,2648	-0,3180
H ₂ O ₂		1	0,9098***	0,8844***	0,8446**	0,9558***	0,9732***	0,9582***
MDA			1	0,6481	0,7780*	0,8895**	0,9236***	0,8759**
Proline				1	0,7232*	0,8550**	0,8493**	0,8983**
CAT					1	0,8383**	0,8267**	0,8053**
SOD						1	0,9751***	0,9901***
POD							1	0,9790***

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$

* $p < 0.05$; ** $p < 10^{-2}$, *** $p < 10^{-3}$ ($n = 9$)

Tableau 17 : Matrice de corrélation de *Pearson* entre toutes les variables analysées et les concentrations d'As dans le milieu de culture pour *F. oxysporum*

Variables	Poids sec	H ₂ O ₂	MDA	Proline	CAT	SOD	POD	APX
As mM	-0,7344**	0,9330***	0,9711***	0,9820***	0,8486***	0,9599***	0,9789***	0,9594***
Poids sec	1	-0,7099**	-0,7137**	-0,7524**	-0,3108	-0,7079*	-0,6235*	-0,6610*
H ₂ O ₂		1	0,9153***	0,9082***	0,7086**	0,9262***	0,8914***	0,9516***
MDA			1	0,9534***	0,8216**	0,9870***	0,9621***	0,9452***
Proline				1	0,8040**	0,9344***	0,9434***	0,9114***
CAT					1	0,8067**	0,9075***	0,8170**
SOD						1	0,9354***	0,9403***
POD							1	0,9603***

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$

* $p < 0.05$; ** $p < 10^{-2}$, *** $p < 10^{-3}$ ($n = 12$)

Annexe 5 : Analyses des séquences

1. Séquences d'*Aspergillus tubingensis* :

>TubAH2-1_Tub1 -- 8..464 of sequence

TGATGTATCTGGAATAGGCCAGATCACCACCAAGGAGCTCGGCACTGTGATGCGCTCCCT
CGGCCAGAACCCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCTGACAA
CAACGGAACGATCGACTTCCCCGGTATGTGATAGATCTACGCCTGTAAGGCGGGAATGCC
GTATGGATTGTGATTGACTTTTGCCGCCAGAATTCCTTACCATGATGGCTCGTAAGATGA
AGGACACCGACTCCGAGGAGGAAATCCGCGAGGCTTCAAGGTCTTCGACCGCGACAACA
ATGTTTCATCTCCGCCGCGGAGTTGCGCCACGTCATGACCTCCATTGGCGAGAAGCTCA
CTGACGACGAAGTCGATGAGATGATCCGTGAGGCTGACCAGGACGGTGTGGCCGCATCG
ACTGTATGTTTCCCATTCTGATATGCCCGTGAAGAA

>TubAH2-1_Tub2 -- 10..467 of sequence

TACGTCGATGCGGCCATCACCGTCCTGGTCAGCCTCACGGATCATCTCATCGACTTCGTC
GTCAGTGAGCTTCTCGCCAATGGAGGTCATGACGTGGCGCAACTCCGCGGCGGAGATGAA
ACCATTGTTGTCGCGGTGGAAGACCTTAAAAGCCTCGCGGATTCCTCCTCGGAGTCGGT
GTCCTTCATCTTACGAGCCATCATGGTAAGGAATTCTGGCGGCAAAAGTCAATCACAATC
CATACGGCATTCCCGCCTTACAGGCGTAGATCTATCACATACCGGGGAAGTCGATCGTTC
CGTTGTTGTCAGCGTCAACCTCGTTGATCATGTCCTGAAGCTCAGACTCGGAGGGGTTCT
GGCCGAGGGAGCGCATCACAGTGCCGAGCTCCTTGGTGGTGTGATCTGGCCTATTTCCAGAT
TACATCAGTATTATGATTCAGATCGAAGGGGGATAAAC

2. Séquences de *Fusarium oxysporum* :

EFFH5-1_EF1 -- 14..673 of sequence

CACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACTGATGAGTACTCTCCTCGACAATGAGCTTATCTG
CCATCGTCAATCCCGACCAAGACCTGGTGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATC
GTTTCACAGACCGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAG
AAGTTGAGAAGGTTAGTCACTTTCCCTTCGATCGCGCGTCCTTGCCCATCGATTTCCC
CTACGACTCGAAATGTGCCGCTACCCGCTCGAGACCAAAAATTTGCAATATGACCGT
GATTTTTTTTTGGTGGGGCACTTACCCCGCACTTGAGCGACGGGAGCGTTTGCCCTCTTA
ACCATTCTCACAACCTCAATGAGTGCGTCGTCACGTGTCAAGCAGTCACTAACCATTCAA
CAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCTTGACAAG
CTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACT
CCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTTCATTCTACTTCTCTT
CGTACTAACATATCACTCAGACGCTCCCGTCCCGTACCGTGATTTTCATCAAGAAATGACGGGG

Annexes

>EFFH5-1_EF2 -- 9..676 of sequence

GACGGTAACGTCTGAGTGATATGTTAGTACGAAAAGAAGTAGAATGAAGCATGAGCGACA
ACATACCAATGACGGTGACATAGTAGCGAGGAGTCTCGAACTCCAGAGAGCAATATCGA
TGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGGCGTACTTGAAGG
AACCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCTATTGTTGAATGGTTAGTGACTGCTTGACACGTG
ACGACGCACTCATTGAGGTTGTGAGAATGGTTAAGAGGGCAAACGCTCCCGTCGCTCAAG
TGGCGGGGTAAGTGCCCCACCAAAAAAATCACGGTCATATTGCAAATTTTTGGTCTCG
AGCGGGGTAGCGGGCACATTTGAGTCGTAGGGGAAATCGATGGGCAAAGGACGCGCGAT
CGAAGGGAAAGTGACTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTGATAACCACCGC
ACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGAAACGATGTCAGTATGTTGACTTTGAGAAATAC
CCCACCAGGTCTTGGTCGGGATTGACGATGGCAGATAAGCTCATTGTGAGGAGAGTACT
CACAGTGGTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAGGTGAGTCTT
GTCCCTTT

***Aspergillus tubingensis* calmodulin (CaM) gene, partial cds**

GenBank: MH189391.1

[FASTA Graphics](#)[Go to:](#)

LOCUS MH189391 450 bp DNA linear PLN 04-JUL-2018

DEFINITION *Aspergillus tubingensis* calmodulin (CaM) gene, partial cds.

ACCESSION MH189391

VERSION MH189391.1

KEYWORDS .

SOURCE *Aspergillus tubingensis*ORGANISM *Aspergillus tubingensis*

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae; *Aspergillus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 450)

AUTHORS Meghnous,O., Dehimat,L., Doumas,P., Kassa-Laouar,M. and Rached,O.

TITLE Antimony impact on anti-oxidant defense of fungal endophytic *Aspergillus tubingensis* isolated from *Hedysarum pallidum* roots in

mine wastes (Djebel Hamimat, Algeria)

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 450)

AUTHORS Meghnous,O., Dehimat,L., Doumas,P., Kassa-Laouar,M. and Rached,O.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (06-APR-2018) Laboratoire de Biologie et Environnement

(LBE), Faculte des Sciences SNV Universite des Freres Mentouri Constantine, Route de Ain El bey, Constantine 25000, Algeria

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..450

/organism="Aspergillus tubingensis"

/mol_type="genomic DNA"

/isolation_source="roots"

/host="Sulla pallida"

/db_xref="taxon:5068"

/PCR_primers="fwd_name: tub1, fwd_seq:

tcgacagctatttccccctt, rev_name: tub2, rev_seq:

tagcatgtcatatcacgggcat"

gene

complement(<1..>450)

/gene="CaM"

mRNA

complement(join(<1..212,280..>405))

/gene="CaM"

/product="calmodulin"

CDS

complement(join(<1..212,280..>405))

/gene="CaM"

/codon_start=3

/product="calmodulin"

/protein_id="AWX67513.1"

/translation="QITTKELGTVMRSLGQNPSESELQDMINEVDADNNGTIDFPEFL

TMMARKMKDTSDEEEIREAFKVFDRDNNGFISAAELRHVMTSIGEKLTDEVDDEMIRE
ADQDGDGRID"

ORIGIN

Annexes

```
1 gtcgatgcgg ccatcacctg cctgggcagc ctcacggatc atctcatcga cttcgtcgtc
61 agtgagcttc tcgccaatgg aggtcatgac gtggcgcaac tccgcggcgg agatgaaacc
121 attggttgcg cggtcgaaga ccttgaaagc ctcgcggatt tcctcctcgg agtcggtgtc
181 cttcatctta cgagccatca tggtaaggaa ttctggcggc aaaagtcaat cacaatccat
241 acggcattcc cgccttacag gcgtagatct atcacatacc ggggaagtcg atcgttccgt
301 tgttgtcagc gtcaacctcg ttgatcatgt cctgaagctc agactcggag gggttctggc
361 cgagggagcg catcacagtg ccgagctcct tggtggtgat ctggcctatt tccagattac
421 atcagtatta tgattcagat cgaaggggga
```

//

Résumés

Résumé :

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence une mycoflore endophyte résistante dans les racines de deux espèces métallophyles *Hedysarum pallidum* Desf. et *Lygeum spartum* L. poussant sur des sols contaminés par l'antimoine (Sb) et l'arsenic (As) dans la région du Djebel Hamimat (Algérie). Le but est également d'étudier la tolérance des mycoendophytes vis-à-vis de la toxicité de Sb et d'As et d'évaluer le niveau du stress oxydatif ainsi que de déterminer les systèmes de défense antioxydants d'*Aspergillus tubingensis* et *Fusarium oxysporum* induits par la toxicité des métalloïdes.

Notre travail met en évidence la présence de mycoendophytes associés aux racines de deux espèces végétales étudiées pour **la première fois en Algérie** : *H. pallidum*, et *L. spartum*. Ces dernières présentent des fréquences de colonisation de 64,58% et 96,87% respectivement. Parmi les mycoendophytes isolés, *Aspergillus tubingensis* a résisté jusqu'à 500 mM de Sb et *Fusarium oxysporum* a toléré 30 mM d'As.

Les tests de toxicité *in vitro* sur *A. tubingensis* et *F. oxysporum*, ont révélé que ceux-ci accumulaient dans leurs biomasses des quantités importantes de Sb et faibles en As. Quant aux indicateurs du niveau de stress oxydant et aux réponses antioxydantes des deux espèces endophytes, les résultats montrent que le MDA, le H₂O₂ et le contenu intracellulaire en proline augmentent de manière significative avec l'augmentation des doses de Sb et d'As dans le milieu de culture. Il apparaît que les réponses antioxydantes varient quantitativement et qualitativement d'une espèce fongique à l'autre, et d'un métalloïde à l'autre. Ces résultats suggèrent que les souches endophytes isolées pourraient être des agents potentiels pour la bioremédiation des sols et des environnements aquatiques contaminés par l'antimoine et l'arsenic.

Mots clés : Mycoendophytes, *Hedysarum pallidum* Desf., *Lygeum spartum*. L, antimoine, arsenic, résistance, bioaccumulation, stress oxydatif, bioremédiation

Abstract:

The aim of this work is to highlight a resistant endophytic mycoflora in the roots of two metallophytic species *Hedysarum pallidum* Desf. and *Lygeum spartum* L. growing on soil contaminated with antimony (Sb) and arsenic (As) in Djebel Hamimat (Algeria) region, to study the toxicity of mycoendophytes with respect to toxicity of Sb and As, to evaluate the level of oxidative stress and the antioxidant defense systems of *Aspergillus tubingensis* and *Fusarium oxysporum* induced by metalloid toxicity.

Our work demonstrates, the presence of mycoendophytes associated with the roots of the two plant species studied for the first time in Algeria; *H. pallidum*, and *L. spartum*. This latter have a colonization frequencies of 64.58% and 96.87% respectively. among the isolated mycoendophytes, only *Aspergillus tubingensis* was resistant to 500 mM Sb, and *Fusarium oxysporum* tolerated 30 mM As.

The toxicity tests *in vitro* on *A. tubingensis* and *F. oxysporum* revealed that these strains accumulated a significant amounts of Sb in their biomass, in contrast to As. As regards the indicators of the oxidative stress level and the antioxidant responses of the two endophytic species, MDA, H₂O₂ and intracellular proline content increase significantly with increasing doses of Sb and As in the culture medium. Antioxidant responses vary quantitatively and qualitatively from a fungal species to another, and from a metalloid to another. This suggests that these endophytic strains may be potential agents for the bioremediation of soil and aquatic environments contaminated with antimony and arsenic.

Key Words : Mycoendophytes, *Hedysarum pallidum* Desf., *Lygeum spartum* L. antimony, arsenic, resistance, bioaccumulation, oxidative stress, bioremediation.

ملخص:

الهدف من هذا العمل هو تسليط الضوء على الفطريات الداخلية المقاومة في جذور نوعين من النباتات المقاومة للسمية المعدنية *Hedysarum pallidum* Desf. و *Lygeum spartum* L. اللتان تنموان على تربة ملوثة بالإثمد (Sb) و الزرنيخ (As) في منطقة جبل حميمات (الجزائر)، و دراسة قابلية الفطريات الداخلية للسمية المتعلقة بالإثمد و الزرنيخ، وكذلك تقييم مستوى الإجهاد التأكسدي و أنظمة الدفاع المضادة للأكسدة لفطري *Aspergillus tubingensis* و *Fusarium oxysporum* الناجم عن سمية الميثالويد.

كشفت نتائج البحث، ولأول مرة في الجزائر وجود فطريات داخلية مرتبطة بجذور نوعين من النباتات المقاومة للمعادن الثقيلة *L. spartum* و *H. pallidum*. هاتين الأخيرتين لهما معدل استعمار 64.58% و 96.87% على التوالي. من بين الفطريات الداخلية المعزولة، فقط *Aspergillus tubingensis* كان مقاوما لـ 500 mM (Sb) ، و تحمل *Fusarium oxysporum* لتركيز يصل إلى 30 mM (As).

كشفت اختبارات السمية لفطري *F. oxysporum* و *A. tubingensis* أن هاذان الفطران يمتصان كميات معتبرة من الإثمد في كتلتها الحيوية على عكس الزرنيخ. فيما يتعلق بمؤشرات مستوى الإجهاد التأكسدي و استجابات مضادات الأكسدة للفطرين المذكورين أعلاه، أن نسبة MDA و H_2O_2 و محتوى البرولين داخل الخلايا تتزايد بشكل معتبر مع زيادة جرعات As و Sb في وسط الاستنبات. تختلف استجابات مضادات الأكسدة من حيث الكم والنوع من فصيلة فطرية إلى أخرى، ومن نوع المعدن إلى آخر. هذا يشير أن السلالات الفطرية الداخلية قد تكون من عوامل الإصلاح الحيوي للتربة والبيئات المائية الملوثة بالإثمد و الزرنيخ.

الكلمات المفتاحية: الفطريات الداخلية، *Hedysarum pallidum* Desf. ، *Lygeum spartum* L. ، الإثمد، الزرنيخ، المقاومة، الامتصاص الحيوي، الإجهاد التأكسدي، الإصلاح الحيوي.

Publication



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

Ouissem Meghnous¹ · Laid Dehimat² · Patrick Dumas³ · Mounia Kassa-Laouar¹ · Fawzia Mosbah¹ · Oualida Rached⁴

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

Abstract

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

Keywords Metalloid · Antioxidants · Endophyte · Fungus · Mine cuttings

Abbreviations

APX Ascorbate peroxidase
CAT Catalase
MDA Malondialdehyde
MIC Minimum inhibitory concentration

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

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

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

Introduction

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

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

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

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

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

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

Materials and methods

Site characteristics and plant sampling

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

Soils and plant roots were taken from the most contaminated spoil of the study area. The soils showed the following physicochemical characteristics: $62,000 \text{ mg kg}^{-1} \pm 4,924 \text{ Sb}$, $2,300 \text{ mg kg}^{-1} \pm 186 \text{ As}$, $0.9 \pm 0.04\%$ Organic matter (OM), $\text{pH } 8.01 \pm 0.09$, $7.8 \pm 1.82\% \text{ CaCO}_3$, $23.0 \pm 4.9\%$ Clay, $16.3 \pm 1.02\%$ Silt, $53.7 \pm 3.22\%$ Sand (Benhamdi et al. 2014).

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

Isolation and selection of endophytes resistant to antimony

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

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

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

Resistant strain identification

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

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

Preparation of fungal biomass for the determination of Sb toxicity biomarkers

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

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

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

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

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

Intracellular H_2O_2 assay

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

Malondialdehyde (MDA) assay

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

Intracellular proline assay

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

Antioxidant enzyme activities assay

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

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

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

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

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

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

Statistical analysis

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

Results

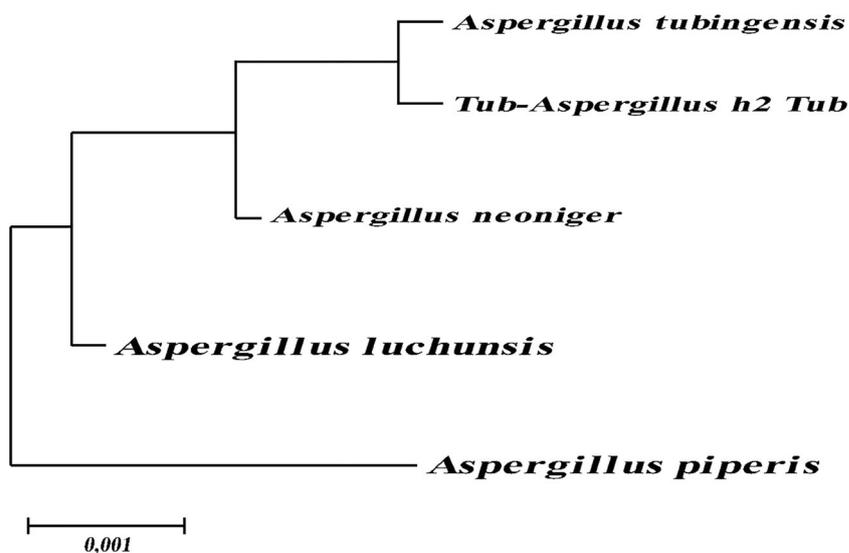
Antimony-resistant strain identification

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

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

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

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



Antimony effect on fungal biomass

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

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

Intracellular H₂O₂ contents

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

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

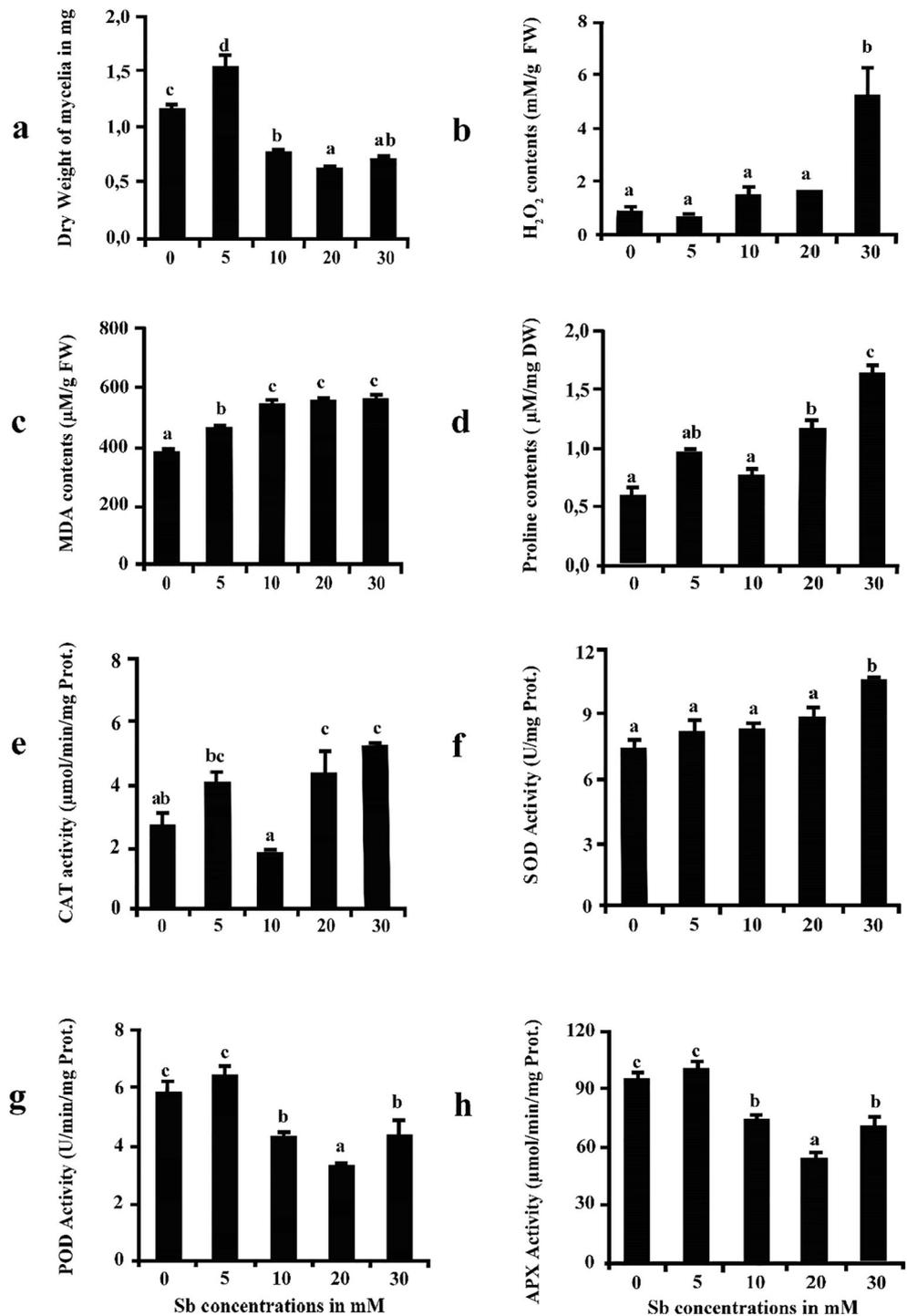


Table 1 Pearson correlation coefficients between all analyzed variables and between those and antimony culture medium concentrations

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

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

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

MDA contents

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

Intracellular proline contents

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

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

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

Antioxidant enzyme activities

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

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

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

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

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

Discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Conclusion

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

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

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

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

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

Compliance with ethical standards

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

References

- Bacal CJO, Yu ET (2017) Cellulolytic activities of a novel *Fomitopsis* sp. and *Aspergillus tubingensis* isolated from Philippine mangroves. *Philipp J Sci* 146:403–410
- Benhamdi A, Bentellis A, Rached O, Du Laing G, Mechakra A (2014) Effects of antimony and arsenic on antioxidant enzyme activities of two Steppic plant species in an old antimony mining area. *Biol Trace Elem Res* 158:96–104. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-9917-7>
- Bentellis A, Azzoug R, El Hadeif El Okki M, Rached O (2014) Trace elements pollution from an abandoned mine and factors affecting Antimony concentrations in the Dahimine Wadi Bank soils (Northeast Algeria). *Carpath J Earth Env* 9:95–106
- Chakraborty S, Mukherjee A, Das TK (2012) Biochemical characterization of a lead-tolerant strain of *Aspergillus foetidus*: an implication of bioremediation of lead from liquid media. *Int Biodeterior Biodegradation* 84:134–142. <https://doi.org/10.1016/j.ibid.2012.05.031>
- Chakraborty S, Mukherjee A, Khuda-Bukhsh AR, Das TK (2014) Cadmium-induced oxidative stress tolerance in cadmium resistant *Aspergillus foetidus*: its possible role in cadmium bioremediation. *Ecotox Environ Safe* 106:46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.007>
- Chance B, Maehly AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol* 2:764–775. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>
- Choi J, Détry N, Kim KT, Asiegbu FO, Valkonen JPT, Lee YH (2014) fPoxDB: fungal peroxidase database for comparative genomics. *BMC Microbiol* 14:117. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-117>
- Clemente R (2013) Antimony. In: Alloway BJ (ed) Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability, 3rd edn. Springer, Dordrecht, pp 497–506
- Demidchik V (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environ Exp Bot* 109:212–228. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>
- Deng Z, Cao L, Huang H, Jiang X, Wang W, Shi Y, Zhang R (2011) Characterization of Cd and Pb-resistant fungal endophyte *Mucor* sp. CBRF59 isolated from rapes (*Brassica chinensis*) in metal contaminated soils. *J Hazard Mater* 185:717–724. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.078>
- Devi KA, Pandey G, Rawat AKS, Sharma GD, Pandey P (2017) The endophytic symbiont—*Pseudomonas aeruginosa* stimulates the antioxidant activity and growth of *Achyranthes aspera* L. *Front Microbiol* 8:1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01897>
- Feng R, Liao G, Guo J, Wang R, Xu Y, Ding Y, Mo L, Fan Z, Li N (2016) Responses of root growth and antioxidative systems of paddy rice exposed to antimony and selenium. *Environ Exp Bot* 122:29–38. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.08.007>
- Huang HB, Feng XJ, Liu L, Chen Bin LYJ, Ma L, She Z-G, Lin YC (2010) Three dimeric Naphtho-γ-Pyrone from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* isolated from *Pongamia pinnata*. *Planta Med* 76:1888–1891
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Ma Y, Rajkumar M, Zhang C, Freitas H (2016) Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *J Environ Manag* 174:14–25. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.047>
- Marklund S, Marklund G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47:469–474. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>
- Mubarak H, Chai LY, Mirza N, Yang ZH, Pervez A, Tariq M, Shaheen S, Mahmood Q (2015) Antimony (Sb) - pollution and removal techniques—critical assessment of technologies. *Toxicol Environ Chem* 97:1–22. <https://doi.org/10.1080/02772248.2015.1095549>
- Mukherjee A, Das D, Mondal SK, Biswas R, Das TK, Boujedaini N, Khuda-Bukhsh AR (2010) Tolerance of arsenate-induced stress in *Aspergillus niger*, a possible candidate for bioremediation. *Ecotox Environ Safe* 73:172–182. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.09.015>
- Nakano Y, Asada K (1980) Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. *Plant Cell Physiol* 21:1295–1307. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076105>
- Pierart A, Shahid M, Séjalon-Delmas N, Dumat C (2015) Antimony bioavailability: knowledge and research perspectives for sustainable agricultures. *J Hazard Mater* 289:219–234. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.011>
- Qayyum S, Khan I, Maqbool F, Zhao Y, Gu Q, Peng C (2016) Isolation and characterization of heavy metal resistant fungal isolates from industrial soil in China. *Pak J Zool* 48:1241–1247
- Raj S, Mohan S (2016) Impact on proline content of *Jatropha curcas* in fly ash amended soil with respect to heavy metals. *J Pharm Pharm* 8:244–247
- Teng Y, Du X, Wang T, Mi C, Yu H, Zou L (2018) Isolation of a fungus *Penicillium* sp. with zinc tolerance and its mechanism

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

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

MEGHNOUS Ouissem

Date de soutenance :08/07/2020

Thème :

Etude de l'aptitude des souches fongiques, isolées de la rhizosphère de deux plantes steppiques de la région minière d'Ain-Babouche, à la remédiation des sols métallifères

Thèse de Doctorat 3^{ème} cycle

Spécialité : Biotechnologie et Bioprocédés, Applications Mycologiques

Résumé : L'objectif de ce travail est de mettre en évidence une mycoflore endophyte résistante dans les racines de deux espèces métallophyles *Hedysarum pallidum* Desf. et *Lygeum spartum* L. poussant sur des sols contaminés par l'antimoine (Sb) et l'arsenic (As) dans la région du Djebel Hamimat (Algérie). Le but est également d'étudier la tolérance des mycoendophytes vis-à-vis de la toxicité de Sb et d'As et d'évaluer le niveau du stress oxydatif ainsi que de déterminer les systèmes de défense antioxydants d'*Aspergillus tubingensis* et *Fusarium oxysporum* induits par la toxicité des métalloïdes.

Notre travail met en évidence la présence de mycoendophytes associés aux racines de deux espèces végétales étudiées pour **la première fois en Algérie** : *H. pallidum*, et *L. spartum*. Ces dernières présentent des fréquences de colonisation de 64,58% et 96,87% respectivement. Parmi les mycoendophytes isolés, *Aspergillus tubingensis* a résisté jusqu'à 500 mM de Sb et *Fusarium oxysporum* a toléré 30 mM d'As.

Les tests de toxicité *in vitro* sur *A. tubingensis* et *F. oxysporum*, ont révélé que ceux-ci accumulaient dans leurs biomasses des quantités importantes de Sb et faibles en As. Quant aux indicateurs du niveau de stress oxydant et aux réponses antioxydantes des deux espèces endophytes, les résultats montrent que le MDA, le H₂O₂ et le contenu intracellulaire en proline augmentent de manière significative avec l'augmentation des doses de Sb et d'As dans le milieu de culture. Il apparaît que les réponses antioxydantes varient quantitativement et qualitativement d'une espèce fongique à l'autre, et d'un métalloïde à l'autre. Ces résultats suggèrent que les souches endophytes isolées pourraient être des agents potentiels pour la bioremédiation des sols et des environnements aquatiques contaminés par l'antimoine et l'arsenic.

Mots clés : Mycoendophytes, *Hedysarum pallidum* Desf., *Lygeum spartum*. L, antimoine, arsenic, résistance, bioaccumulation, stress oxydatif, bioremédiation

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Biologie et Environnement

Président : Pr. KACEM CHAOUICHE N.	Univ. des Frères Mentouri - Constantine 1
Directrice : Pr. DEHIMAT L.	Univ. des Frères Mentouri - Constantine 1
Co-directeur : Pr. RACHED O.	ENSB Taoufik Khaznadar
Examineurs : Pr. SOUMATI B.	Univ. Badji Mokhtar – Annaba
Pr. HAMIDECHI M.A.	Univ. des Frères Mentouri – Constantine 1
Pr. AFRI-MEHENNAOUI F.Z.	Univ. des Frères Mentouri Constantine 1

Année universitaire 2019/2020