

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Mentouri-Constantine**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biochimie et Microbiologie**

N° d'ordre :299/Mag/2012

N° de série :012/Mic/2012

## **Mémoire**

**En vue de l'obtention du Diplôme de Magister en Biochimie**

**Option: Technologie des Explorations Biochimiques**

**Présenté par : SAKHRI Afaf**

### **Thème**

**Isolement des mycètes producteurs de la  
stérigmatocystine à partir d'aliment (maïs) et  
étude de son effet toxique sur *Wistar albinos***

Soutenu le : 18/11/2012

**Devant le jury :**

**Président:** Mr. DEHIMAT L. Prof. Université Mentouri, Constantine.

**Rapporteur:** Mr. KACEM CHAOUCHE N. Prof. Université Mentouri, Constantine.

**Examineurs:** Mr. BENSEGUENI A. M.C.A. Université Mentouri, Constantine.

Mr. CHIKHI A. M.C.A. Université Mentouri, Constantine.

**Année universitaire 2011-2012**

## **Remerciements**

*L'exercice académique de remerciements en début de mémoire est un peu réducteur du sentiment de gratitude que je souhaite exprimer pour faire part de ma reconnaissance, mais je sacrifierai à la tradition, en m'excusant par avance auprès des personnes que je pourrai oublier.*

### **A mes juges**

#### **- Mr KACEM CHAUCHE N.**

*Professeur à l'université Mentouri de Constantine; Je voudrais vous remercier de m'avoir accueilli au sein de votre équipe de laboratoire de « Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne » à l'université Mentouri Constantine où ce mémoire a été réalisée. Ces années passées dans votre laboratoire auront été pour moi une expérience unique et enrichissante, tant du point de vue scientifique qu'humain. Je ne pourrai jamais vous remercier assez pour votre soutien, vos précieux conseils et votre apport au cours de ces travaux de mémoire.*

#### **-Mr DEHIMAT L.**

Professeur à l'université Mentouri de Constantine; Mes sincères remerciements pour avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que président du jury. Vos qualités scientifiques et votre intérêt pour la recherche sont pour nous une source de motivation supplémentaire pour la suite de notre carrière.

#### **-Mr BENSEGUENI A.**

Maitres de conférences à l'université Mentouri de Constantine; Je suis particulièrement heureuse de bénéficier de vos critiques et je vous exprime ma profonde considération.

#### **-CHIKHI A.**

Maitres de conférences à l'université Mentouri de Constantine; Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail.

### **A tous ceux qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de ce travail**

**A Mlle KARA ALI W.** Maître assistant à l'université de Khenchela, pour son aide, sa gentillesse et son soutien tout au long de la réalisation de l'étude *in vivo*.

**A Mme BELLETRACH. C,** Professeur au CHU de Constantine, pour sa contribution et son aide concernant la réalisation des analyses biochimiques.

**A Mr KHEDRAOUI,** Professeur CHU de Batna de m'avoir accueilli dans le laboratoire d'anatomie pathologique ainsi que Mme Benamira, pour son aide précieuse dans la réalisation des coupes histologiques.

**A Mme KACEM-CHAUCHE A.** Maitre de conférences à l'université de Constantine pour son aimable aide, son soutien, sa sympathie et ses encouragements.

**A tous mes enseignants de l'université de Batna et ceux de l'université de Constantine,** qui m'ont donné les bases de la science.

**A l'ensemble des membres de laboratoire de Mycologie appliquée et de l'activité microbienne :** je les remercie toutes.

**A tous les membres de laboratoire d'anatomie pathologique du CHU de Batna.**

Ce remerciement ne peut terminer sans un immense Merci à **mes collègues de promotion** pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

## *Dédicaces*

*Je dédie cet événement marquant de ma vie à mes parents formidables*

Merci pour vos sacrifices sans relâche pour que vos enfants grandissent et prospèrent.

*Merci de m'avoir permis de réaliser ces longues études et celles à venir!*

*Merci pour l'éducation et les valeurs que vous m'avez transmises.*

*Merci pour tout l'amour que vous me portez et toute la confiance que vous m'accordez.*

*Aux fleurs de ma vie mes sœurs ainsi que mes très chers frères*

*Vous avez toujours été là pour me soutenir et m'encourager pendant mes études.*

Merci pour votre soutien sans faille que vous m'avez toujours apporté aussi bien dans les moments difficiles que radieux.

*Merci pour votre amour, votre assistance, votre compréhension.*

*A tous mes proches.*

*À mes amis :*

Vous encouragements étaient la bouffée d'oxygène qui me ressourçait dans les moments pénibles, de solitude et de souffrance, où l'on a terriblement besoin d'un petit mot, d'un petit geste, aussi humble soit-il, de soutien moral.

*Merci de m'avoir pardonné mes absences, mes irritabilités et mes coups de déprime.*

*Merci pour les inoubliables moments partagés dans la vie.*

# Table des matières

1- Introduction.....	1
2- Revue Bibliographique.....	3
2.1- Généralités sur les mycètes.....	3
2.2- Les moisissures toxigènes et les denrées alimentaires.....	4
2.3- Contamination de maïs par les moisissures.....	5
2.4- Les mycotoxines.....	6
2.4.1- Nature et origine des mycotoxines.....	6
2.4.2- Effets des mycotoxines.....	6
2.4.3- Les moisissures mycotoxinogènes.....	7
2.5- La stérigmatocystine.....	8
2.5.1- Structure de la stérigmatocystine.....	8
2.5.2- Toxicité de la STC.....	9
2.5.3- Les moisissures stérigmatogènes.....	10
2.5.3.1- Genre <i>Aspergillus</i> .....	10
i. Généralité.....	10
ii. Caractères cultureux généraux.....	11
iii. Morphologie microscopique.....	11
iv. Téléomorphe.....	12
2.5.3.2- <i>Aspergillus nidulans</i> .....	12
i. Généralité.....	12
ii. Caractères cultureux.....	13
iii. Morphologie microscopique.....	14
iv. Biosynthèse de la STC par <i>A. nidulans</i> .....	14
2.5.4- Contrôle de la STC.....	17
3- Matériel et Méthodes.....	18
3.1- Échantillonnage.....	18

3.2- Mesure du taux d'humidité.....	18
3.3- Analyse mycologique.....	18
3.3.1-Triage des grains.....	18
3.3.2- Désinfection de la surface des grains.....	18
3.3.3- Isolement des mycètes.....	19
3.3.4- Purification des isolats.....	19
3.3.5- Conservation des isolats.....	19
3.3.5.1- Gélose inclinée.....	19
3.3.5.2- Congélation des cultures sporulées.....	20
3.3.6- Identification des isolats.....	20
3.3.6.1- Identification des genres.....	20
3.3.6.2- Identification des espèces.....	20
3.4- Recherche de la STC dans les échantillons de maïs.....	21
3.4.1- Extraction de la STC à partir des grains de maïs.....	22
3.4.2- Détection de la STC par CCM.....	22
3.5- Production de la STC par l'isolat.....	24
3.5.1- Préparation du milieu de fermentation.....	24
3.5.2- Ensemencement du milieu de fermentation.....	24
3.5.3- Extraction de la STC à partir du milieu de fermentation.....	25
3.5.4- Détection par CCM.....	25
3.6- Étude de la toxicité subaigüe de la STC <i>in vivo</i> .....	27
3.6.1- Animaux de l'expérience.....	27
3.6.2- Répartition des rats.....	27
3.6.3- Évolution de poids corporel des rats.....	27
3.6.4- Sacrifice des animaux.....	27

3.6.5- Prélèvement sanguin.....	28
3.6.6- Dosage des transaminases.....	28
3.6.6.1- Principe de la réaction des transaminases.....	28
3.6.7- Étude Histologique du foie.....	28
3.6.8- Analyse statistique des résultats.....	29
4- Résultats et Discussion.....	30
4.1- Mesure du taux d'humidité.....	30
4.2- Analyse mycologique.....	30
4.2.1- Isolement et identification des mycètes.....	30
4.2.2- Étude morphologique de la souche sélectionnée.....	35
4.2.2.1- Aspect macroscopique.....	35
4.2.2.2- Aspect microscopique.....	36
4.3- Recherche de la STC dans les échantillons de maïs.....	38
4.3.1- Extraction de la STC à partir des grains de maïs.....	38
4.3.2- Détection de la STC par CCM.....	38
4.4- Production de la STC.....	39
4.4.1- Cinétique de la croissance d' <i>Aspergillus nidulans</i> .....	39
4.4.2- Extraction de la STC à partir du milieu de fermentation.....	41
4.4.3- Détection de la STC par CCM.....	41
4.5- Étude de la toxicité subaigüe de la STC <i>in vivo</i> .....	42
4.5.1- Signes de toxicité.....	43
4.5.2- Évolution de poids corporels des rats.....	43
4.5.3- Poids du foie.....	44
4.5.4- Dosage des transaminases.....	45
4.6- Étude histologique.....	46

4.6.1- Examen macroscopique.....	46
4.6.2- Examen microscopique.....	46
4.6.2.1- Foie des rats témoins.....	46
4.6.2.2- Foie des rats traités.....	47
5-Conclusion et perspectives.....	50
6- Références bibliographiques	52
Annexes	
Résumés	

## Liste des abréviations

**AFB1** : Aflatoxine B1

**ALAT**: Alanine Amino Transférase

**A. nidulans** : *Aspergillus nidulans*

**ASAT**: Aspartate Amino Transférase

**a<sub>w</sub>** : Water Activity

**CCM** : Chromatographie sur Couche Mince

**CIRC** : Centre International de la Recherche sur le Cancer

**CYA**: Czapek Yeast Extract Agar

**DL50**: Dose Létale 50

**F**: *Fusarium*

**FAO**: Food and Agriculture Organization

**G25N**: 25% Glycérol Nitrate Agar

**HPLC**: Chromatographie liquide haute performance

**LOD**: Limit Of Detection

**LOQ**: Limit Of Quantification

**MEA**: Malt Extract Agar

**NS**: Non Significant

**P**: *Penicillium*

**PDA**: Potatoes Dextrose Agar

**RF**: Rapport Frontal

**SD**: Standard Deviation

**SFP**: filter paper soaked with NaCl solution

**SPSS:** Statistical Package for the Social Sciences

**STC:** Stérigmatocystine

**UI/L :** Unité International/Litre

**UV :** Ultra Violet

**VI :** Voie Intrapéritonéale

**VO:** Voie Orale

**YES:** Yeast Extract Sucrose

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Moisissures et mycotoxines retrouvées dans certains aliments.....	5
<b>Tableau 2 :</b> Les principales mycotoxines et leurs effets.....	7
<b>Tableau 3 :</b> Quelques espèces fongiques productrices de mycotoxines.....	8
<b>Tableau 4 :</b> DL50 de la stérigmatocystine chez différentes espèces animales en fonction de la voie d'administration.....	10
<b>Tableau 5:</b> Isolats fongiques obtenus des trois échantillons de grains de maïs.....	34
<b>Tableau 6:</b> Caractères macroscopiques de la souche <i>Aspergillus nidulans</i> .....	35

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Structure chimique de la stérigmatocystine et de l'aflatoxine B1.....	9
<b>Figure 2:</b> Principaux caractères microscopiques des <i>Aspergillus</i> .....	12
<b>Figure 3 :</b> Observation microscopique d' <i>Aspergillus nidulans</i> .....	14
<b>Figure 4:</b> Voie de biosynthèse de l'aflatoxine B1 et de la stérigmatocystine.....	16
<b>Figure 5 :</b> Schéma de culture des isolats fongiques (souche 1 et 2) destinés à leur identification.....	21
<b>Figure 6 :</b> Schéma de l'extraction et la séparation de la STC à partir des grains de maïs.....	23
<b>Figure 7 :</b> Schéma de l'extraction et la séparation de la STC à partir de milieu de fermentation liquide.....	26
<b>Figure 8:</b> Moisissures isolées des échantillons de maïs observées au microscope optique.....	33
<b>Figure 9:</b> Aspect des colonies de la souche <i>A. nidulans</i> sur le milieu CYA à 37°C.....	36
<b>Figure 10 :</b> Aspect microscopique d' <i>Aspergillus nidulans</i> sous microscope optique...	37
<b>Figure 11:</b> Organe de reproduction chez <i>Emericella nidulans</i> .....	37
<b>Figure 12 :</b> Extrait à partir des grains de maïs .....	38
<b>Figure 13:</b> Chromatogramme (CCM) des échantillons de maïs sous lumière UV 365 nm.....	39
<b>Figure14 :</b> Cinétique de croissance d' <i>Aspergillus nidulans</i> .....	40
<b>Figure 15 :</b> Extrait chloroformique de la fermentation.....	41
<b>Figure 16 :</b> Chromatographie sur couche mince présentant les spots de la STC produite par <i>A. nidulans</i> après 15 jours de fermentation.....	42
<b>Figure 17:</b> Évolution du poids des rats témoins et traités durant les deux semaines de traitement.....	44
<b>Figure 18:</b> Effets de la STC sur le poids des foies des rats témoins et traités.....	45
<b>Figure 19:</b> évaluation de l'activité enzymatique des transaminases des rats témoins et traités après deux semaines de traitement.....	46
<b>Figure 20:</b> Histologie du foie des rats témoins.....	47
<b>Figure21 :</b> Histologie du foie des rats traités.....	48
<b>Figure 22 :</b> Histologie du foie des rats traités (suite).....	49

# Introduction

## **1- Introduction**

Les moisissures, champignons filamenteux microscopiques apparus sur terre il y a 550 millions d'années, sont très nombreuses, cosmopolites, saprophytes, symbiotes ou parasites (Lavaud et *al.*, 2008). Le développement des moisissures à la surface et dans les produits destinés à l'alimentation est très souvent constaté, en particulier dans les denrées stockées. Or l'étalement dans le temps de la consommation (fruits saisonniers consommés toute l'année) et l'augmentation des transports internationaux des denrées alimentaires nécessitent de plus en plus la réalisation de stocks (Leclerc, 2005). Ce n'est que vers le début du 20<sup>ème</sup> siècle que les propriétés toxiques de ces champignons commencent à être soupçonnées.

Les champignons toxiques produisent un certain nombre de métabolites secondaires nocifs qualifiés de mycotoxines, ces dernières représentent un danger pour la santé publique, soit directement lorsqu'elles sont présentes dans l'alimentation humaine, soit de manière indirecte lorsqu'elles contaminent la chaîne alimentaire via l'alimentation du bétail (Bejaoui, 2005). Selon la FAO, au moins 25% des cultures alimentaires sont contaminées par les mycotoxines au moment où la production agricole des produits de base soutient à peine la croissance de la population mondiale (Nafees, 2009). Dans les pays industrialisés, des normes strictes sur les produits importés ont été adoptées pour cerner les problèmes engendrés par ces substances. Tandis que les pays en développement ne sont pas encore protégés contre les aliments contaminés (Canadas, 2006). En raison de ces mesures, les produits les plus contaminés risquent d'être orientés vers les marchés où la législation est moins contraignante.

Depuis plusieurs années, les cancérologues pensent que des facteurs alimentaires sont impliqués dans l'étiologie de certains cancers (approximativement 35% des cancers). De nombreuses données épidémiologiques ont montré des associations fréquentes entre la consommation de certains aliments et l'incidence de certains cancers à titre d'exemple, le cancer du foie et la contamination en aflatoxine B1 (Tozlovanu, 2008). Actuellement, la question de l'implication d'une autre mycotoxine, la stérigmatocystine, dans des tumeurs malignes en Chine est posée avec insistance (Chen et *al.*, 2010). De ce fait, cette dernière a retenu notre attention et est présentée de façon plus détaillée ci-après.

À l'issue de plusieurs tests toxicologiques, la STC a été montrée cancérogène (Hicks et *al.*, 1997; XU-Ming et *al.*, 2002; Peña Montes et *al.*, 2009). Elle semble être liée à la survenue du

carcinome hépatocellulaire, gastrique et œsophagien (Chen et *al.*, 2010). En 1987, la STC est répertoriée par le centre international de la recherche sur le cancer (CIRC) comme « potentiellement cancérigène pour l'homme » (groupe 2B). Par ailleurs, la STC est le précurseur de la mycotoxine la plus cancérigène que l'on connaisse; l'aflatoxine B1 (Abdel-Wahhab et *al.*, 2005). Aussi, les principaux producteurs de cette mycotoxine appartiennent au genre *Aspergillus* (Veršiloveskis et *al.* 2008), ce qui pose un vrai problème en raison de la distribution ubiquitaire de ces moisissures et, surtout, de l'absence des méthodes de contrôle de la contamination des aliments par ces moisissures et leurs mycotoxines (Tozlovanu, 2008).

En Algérie, à notre connaissance, il n'y a pas des normes ou des limites réglementaires fixant les teneurs maximales des mycotoxines dans l'alimentation humaine ou animale. La situation est plus préoccupante lorsqu'on se rend compte que la quasi-totalité de certains produits, comme le maïs, est importé d'où le contrôle qualitatif de cet aliment est plus que nécessaire. Ainsi, l'identification de la flore contaminant potentielle de maïs commercialisé et l'inventaire de ses toxines est d'une grande importance.

Aussi, l'objectif de cette étude est d'évaluer la qualité mycologique des grains de maïs importé et commercialisé pour sélectionner une souche productrice de la stérigmatocystine et démontrer l'effet toxique de cette mycotoxine *in vivo*.

La stratégie de ce travail repose sur les axes suivants :

- Isolement et identification des souches de moisissures susceptibles de contaminer naturellement des échantillons de maïs importé et commercialisé à la ville de Constantine;
- Sélection de souches potentiellement stérigmatogènes;
- Production, extraction et purification de la STC;
- Étude, *in vivo*, de l'effet toxique de la STC sur l'organe cible, le foie.

# Revue Bibliographique

## **2- Revue Bibliographique**

### **2.1- Généralités sur les mycètes**

Les mycètes, communément appelés champignons, sont des organismes ubiquitaires qui se trouvent dans tous les milieux. On les rencontre dans les forêts, à l'intérieur des habitats humides, dans les salles de bain, les cuisines, sur les tapisseries, mais aussi sur les céréales, les fruits, les légumes, le fromage, le pain, etc. (Nafees, 2009). Les mycètes constituent un règne autonome appelé *Mycota* qui comprend 60 000 à 100 000 espèces (Reboux et al., 2010). Suite aux apports de la biologie moléculaire, le règne des mycètes est divisé en six divisions qui sont *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Glomeromycota* et *Deuteromycota* (Lecompte, 2008).

Ce sont des organismes eucaryotes uni- ou multicellulaires, incluant des espèces macroscopiques (macromycètes) et d'autres microscopiques (micromycètes), d'aspect filamenteux ou lévuriforme (Tabuc, 2007). Les micromycètes multicellulaires, appelés couramment moisissures, ont la forme de filaments. Ces filaments peuvent être divisés par des cloisons, ou septa (septum au singulier), formants des unités qui ressemblent à des cellules distinctes. On les appelle hyphes segmentés ou septés. Dans d'autres classes de mycètes, les hyphes ne contiennent pas de cloisons; ils sont appelés siphons ou cénocytes (Tortora, 2003). L'ensemble des hyphes (cloisonnés ou non) constitue un réseau visible à l'œil nu sous forme de petites taches colorées à la surface de substrats moisis. Ce réseau forme la partie végétative du mycète nommée mycélium (Chasseur et Nolard, 2003).

Il s'agit d'organismes hétérotrophes qui vivent au dépend soit, de la matière organique morte (saprophytes), soit des métabolites des autres organismes (parasites ou symbiotes). Leur nutrition s'effectue par l'émission d'enzymes et d'acides sur le substrat, puis ils absorbent les nutriments ainsi libérés à travers leur paroi; des absorbotrophes (Roquebert, 1997). Les mycètes se développent, en général, dans les endroits obscurs, humides et mal aérés, le plus souvent, entre 20°C et 30°C avec une activité d'eau ( $a_w$ ) entre 0,85 à 0,98 et un pH entre 5,5 à 9 (Reboux, 2006). Ces microorganismes sont dotés de deux modes de reproduction: sexuée et asexuée. Une espèce fongique peut se présenter dans une culture soit sous forme sexuée (téléomorphe), asexuée (anamorphe) ou sous les deux formes (holomorphe) (Chabasse et al., 2002). La reproduction asexuée est le mode commun de la plupart des mycètes qui peut se

faire de plusieurs façons, la plus commune est la production des spores endogènes ou exogènes. Ces dernières sont appelées conidies et sont portées par des structures spéciales nommées conidiophores (Chasseur et Nolard, 2003).

Les moisissures peuvent avoir un effet bénéfique dans différents domaines (la fabrication du fromage dans le domaine agroalimentaire et des antibiotiques dans le domaine thérapeutique). A côté de ces moisissures utiles, on retrouve des moisissures indésirables, toxigènes, responsables de problèmes économiques ou encore elles sont dangereuses pour la santé suite à leur production de mycotoxines (Ellis et *al.*, 2008).

## **2.2- Les moisissures toxigènes et les denrées alimentaires**

Une espèce fongique toxigène est une espèce dont certaines souches sont susceptibles d'élaborer ou de provoquer, dans certaines conditions, l'apparition d'un ou de plusieurs substances toxiques. La formation de ces métabolites peut résulter de trois mécanismes différents: la transformation d'un substrat non toxique en un produit toxique par le biais des bioconversions; la déviation du métabolisme normal de la plante, aboutissant à la formation de produits toxiques ou la production, proprement dite, des mycotoxines, métabolites secondaires propres à la souche fongique (Leclerc et *al.*, 2005).

Les moisissures sont capables de provoquer d'importantes détériorations, dans le domaine agronomique. Ainsi, leur présence indésirable donne aux aliments des odeurs moisies et modifient leurs aspect via la production de pigments, comme la mélanine. Il y a donc une réduction quantitative et qualitative de la valeur alimentaire de la denrée, accompagnée d'une baisse du rendement des récoltes. Les métabolites produits par ces champignons lors de leur croissance sont aussi des éléments majeurs dans l'altération des denrées alimentaires dont les mycotoxines sont les plus graves en raison de risque d'intoxication (Nguyen, 2007). Les aliments touchés par les moisissures toxigènes peuvent être d'origine animale ou végétale. Les céréales sont les denrées alimentaires végétales les plus fréquemment contaminées (en plein champ ou lors du stockage). Les autres produits d'origine végétale sont les fruits (y compris leurs jus et leurs produits de fermentation tels que les vins, le cidre et leurs dérivés secs), les épices, le café et le cacao. Des produits et aliments d'origine animale tels que le lait, le sang, les abats et tout ce qui en dérive doivent retenir l'attention (tableau 1), du fait qu'ils peuvent contenir des traces de mycotoxines ou des dérivés des mycotoxines contenues dans les aliments ingérés par les animaux d'élevage (AFSSA, 2009).

**Tableau 1** : Moisissures et mycotoxines retrouvées dans certains aliments (Nguyen, 2007).

Moisissure	Mycotoxine	Denrées
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxines	Maïs, riz, cacahuète, graines de coton, de potiron, haricots, tissus d'animaux (jambon, lard, saucisse), lait et dérivés
	Stérigmatocystine	
	Ochratoxines A	
<i>Fusarium</i>	Trichothécènes (déoxynivalénol, toxine-T2, diacétoxyscirpénol), fumonisines, zéaralénone, moniliformine, fusarenone	Blé, maïs, orge, riz, seigle, avoine, noix
<i>Penicillium</i>	Patuline, ochratoxine A, citrinine, acide cyclopiazonique, pénitrem A	Fruits et jus de fruits, blé et dérivés, riz, fromage, noix
<i>Alternaria</i>	Alternariol, acide tenuazonique	Fruits, légumes et produits dérivés de pommes et tomates
<i>Claviceps</i>	Alcaloïdes de l'ergot	Blé et dérivés, seigle

Le développement des moisissures toxigènes est favorisé dans les pays d'Afrique, d'Asie du Sud et de l'Amérique Latine, où la dominance de chaleur et d'humidité se conjuguent. Ainsi le maïs, le riz et le millet, aliments de base des populations de ces pays, sont souvent contaminés par les aflatoxines (Nguyen, 2007). Plusieurs autorités ont suggéré que le maïs est une source de maladie sur le plan nutritionnel, liée à sa consommation comme un aliment de base (Dutton, 2009). Cette réalité est liée à la sensibilité élevée du maïs à la contamination par les mycotoxines, en comparaison avec les autres céréales, comme le blé, qui sont résistantes ou seulement modérément sensible à cette contamination (Zinedine et Mañes, 2009).

### 2.3- Contamination de maïs par les moisissures

Les conditions spécifiques de la température, de l'humidité relative et de la teneur en eau présentes lors du stockage de maïs peuvent contribuer à sa détérioration rapide, suite à la croissance fongique. La présence des micromycètes pourrait être attribuée à l'infection de maïs au stade pré-récolte (dans le champ), des espèces appartenant essentiellement au genre *Fusarium*, et/ou au stade post-récolte (pendant le stockage) ce sont, essentiellement, des espèces d'*Aspergillus* ou de *Penicillium* (Pitt et Hocking, 2009). Ces infections peuvent provoquer la décoloration des grains, le changement de leurs caractéristiques chimiques et nutritionnelles, la réduction de la germination et, surtout, la contamination par des mycotoxines (Franzolin, 1999).

## **2.4- Les mycotoxines**

### **2.4.1- Nature et origine des mycotoxines**

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires, toxiques, de faible poids moléculaire (entre 200 et 10.000 daltons), excrétées par certaines moisissures qui se développent sur divers produits agricoles sous des conditions environnementales particulières (Krska, 2009). À ce jour, 300 à 400 mycotoxines sont connues (Pamel et *al.*, 2010).

Il s'agit de petites molécules peu solubles dans l'eau, peu volatiles et difficilement métabolisées par les organismes vivants. Elles sont très stables à l'acidité et à la chaleur (Ruppel et *al.*, 2004). L'origine chimique des mycotoxines est très diverse, certaines dérivent des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxine, patuline, stérigmatocystine), d'autres des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique) et les derniers sont des dérivés terpéniques (désoxynivalénol, diacétoxyscirpénol, fusarénone,) (Leclerc et *al.*, 2005).

### **2.4.2- Effets des mycotoxines**

Les mycotoxines constituent un danger imminent qui tire le signal d'alarme, en raison des pertes économiques importantes qui sont liées à leurs effets sur la santé de l'homme, sur la productivité animale et sur le commerce national et international. La FAO estime que plus de 25 % des récoltes mondiales sont significativement contaminées par des mycotoxines (Krska, 2009).

L'ingestion d'aliments contaminés par les mycotoxines peut être à l'origine de toxicités aiguës ou chroniques nommées mycotoxicoses. Cependant, les intoxications aiguës sont rares, spécifiquement chez l'homme, en raison des faibles quantités pouvant être ingérées avec des aliments contaminés. Mais, l'intoxication chronique est souvent à craindre et ce, à cause de l'effet cumulatif des doses fixées sur des organes cibles, tels que le foie ou le rein (Leclerc et *al.*, 2005). Les mycotoxines peuvent aussi avoir des effets carcinogènes, mutagènes, tératogènes et immunosuppresseurs (tableau 2). En outre, certaines mycotoxines peuvent altérer des réactions immunitaires et réduire ainsi, la résistance aux infections. Du coup, il est, maintenant, largement considéré comme leur effet le plus important, surtout dans les pays en développement (Pamel et *al.*, 2010).

**Tableau 2:** Les principales mycotoxines et leurs effets (Brochard et Le Bâcle, 2009).

<b>Mycotoxines</b>	<b>Effets avérés ou suspectés</b>
Aflatoxines	Hépatotoxique – Mutagène – Cancérogène – Immunotoxique
Citrinine	Néphrotoxique
Fumonisine B1	Neurotoxique – Hépatotoxique – Immunotoxique – Cancérogène
Ochratoxines	Néphrotoxique – Cancérogène - Mutagène
Patuline	Neurotoxique – Mutagène ( <i>in vitro</i> )
Pénitrème A	Neurotoxique
Stérigmatocystine	Hépatotoxique - Cancérogène
Trichothécènes	Hématotoxique– Hépatotoxique - immunotoxique – Cancérogène
Zéaralénone	Ostrogénique – Effet sur la fertilité et la reproduction

### 2.4.3- Les moisissures mycotoxinogènes

Les mycotoxines sont produites par de nombreuses moisissures, dotées génétiquement d'un pouvoir toxinogène (Reboux, 2006). Plus de 150 moisissures mycotoxinogènes sont connues actuellement, elles appartiennent principalement aux genres *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* (Pamel et al., 2010). Parmi ces genres, seules certaines espèces et parfois, certaines souches au sein d'une espèce, sont capables d'excréter des mycotoxines (Ruppel et al., 2004). Certaines mycotoxines sont étroitement liées à des espèces fongiques spécifiques alors que, d'autres sont élaborées par de nombreuses espèces appartenant à des genres différents (tableau 3). Les mycotoxines sont produites soit, dans le champ lors du développement de la plante (toxines du champ) soit, après la récolte (toxine du stockage) (AFSSA, 2009). De manière générale, les conditions environnementales nécessaires à la production de mycotoxines sont plus étroites que celles permettant la croissance fongique (Tabuc, 2007).

**Tableau 3:** Quelques espèces fongiques productrices de mycotoxines (Atoui, 2006).

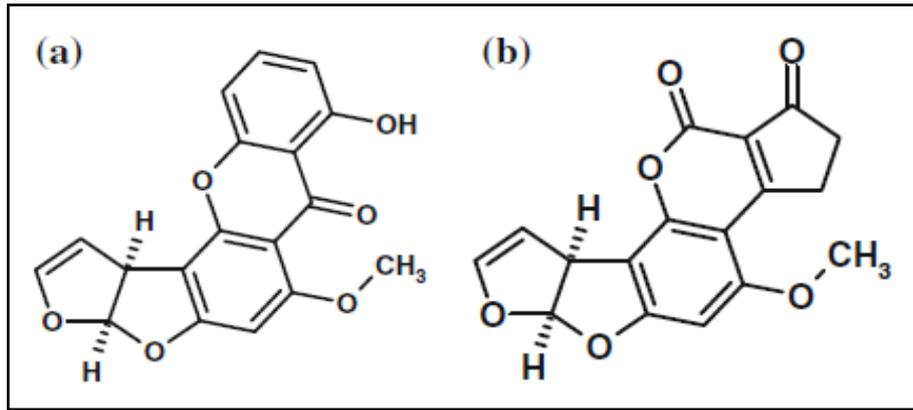
<b>Mycotoxine</b>	<b>Moisissure</b>
Aflatoxines B1, B2, G1 et G2	<i>Aspergillus parasiticus, A. flavus</i>
Citrinine	<i>P. citrinum, Monascus ruber</i>
Déoxynivalénol (DON), Nivalenol, Fusarenone, Toxine T2	<i>F. tricinctum, Fusarium sp.</i>
Fumonisines	<i>F. moniliforme, F. proliferatum, Fusarium sp.</i>
Monolifirmine	<i>F. proliferum, F. Subglutinans</i>
Ochratoxines A, B, C	<i>A. ochraceus, A. carbonarium</i> <i>Penicillium verrucosum, P. nordicum</i>
Patuline	<i>P. ochraceus, P. cyclopium, P. Puberulum</i>
Stérigmatocystine	<i>A. nidulans, A. versicolor</i>
Zéaralénone	<i>Fusarium roseum, Fusarium sp.</i>

## 2.5- La stérigmatocystine (STC)

### 2.5.1- Structure de la stérigmatocystine

La stérigmatocystine est une mycotoxine qui appartient à la famille des polycétoacides (Yu et Leonard, 1995 ; Brown et *al.*, 1996). Elle a été isolée pour la première fois en 1954 par Hatsuda et *al.* à partir d'un isolat d'*Aspergillus versicolor* (Hitokoto et *al.*, 1982). Huit ans après, sa structure a été établie par Bullock et *al.* (Schmidt et *al.*, 1981). Il s'agit d'un noyau xanthone attaché à une structure bifurane (figure 1) (Hodges et *al.*, 1994).

La STC a été désignée, pour la première fois, comme un précurseur biogénique de l'aflatoxine B1 (AFB1) par Holker, Underwood et Thomas basés sur la réalité que les deux molécules contiennent un anneau bifurane (Bennett et *al.*, 1989). L'AFB1 est la mycotoxine la plus intensivement étudiée et reconnue comme étant le cancérigène naturel le plus puissant (Rank et *al.*, 2011).



**Figure 1** : Structure chimique : (a) de la stérigmatocystine, (b) de l'aflatoxine B<sub>1</sub> (Veršilovskis et Bartkevičs, 2012).

### 2.5.2- Toxicité de la STC

La STC est parmi les substances les plus toxiques et cancérigènes produites dans la nature. La toxicité de la STC est, principalement, limitée au foie (Chen et *al.*, 2010) et ses doses létales 50 (DL50) sont répertoriées dans le tableau 4.

Comme un cancérigène du foie, la STC semble être 150 fois moins puissante que l'AFB<sub>1</sub>, mais c'est encore beaucoup plus puissante que la plupart des autres carcinogènes du foie (Pitt et Hocking, 2009). Plusieurs études ont évoqué les effets cancérigènes de la STC sur les tissus humains (Xu-Ming et *al.*, 2002). En 1987, la STC a été classée par le CIRC dans le groupe 2B (potentiellement cancérigène pour l'homme) (Piontek, 2007). L'acquisition des propriétés cancérigènes passe par la transformation de la STC dans le foie, par le système P450 en un analogue de 8,9-époxyde qui réagit préférentiellement avec la guanine, comme l'époxyde issu de la transformation des aflatoxines (Brochard, 2005).

Les propriétés cancérigènes de la STC ont été démontrées chez l'animal (Rabie et *al.*, 1977; Mettwally et *al.*, 1997; Versiloveškis et *al.* 2008) avec une spécificité d'organe variant avec les espèces, la voie et la fréquence d'administration (Essigmann, 1979). Chez les rats, elle induit des carcinomes hépatiques après administration par voie orale (VO) ou par voie intrapéritonéale (VI). Cependant, après une application répétée sur la peau rasée des rats, elle induit des carcinomes squameux de la peau (Engelhart et *al.*, 2002; Brochard et Le Bâcle, 2009). Chez les souris, après administration par VO, la STC induit des tumeurs du poumon (Engelhart et *al.*, 2002; Abdel-wahhab et *al.*, 2005). L'apparition des carcinomes hépatocellulaires chez le singe a, également, été rapportée après administration par VO. La

STC a aussi été rapportée d'être mutagène et tératogène (Kato et *al.*, 2003; Wilkinson et *al.*, 2004).

En revanche, les effets de la STC sur la santé chez les personnes exposées par voie respiratoire n'ont jamais été explorés (Brochard et Le Bâcle, 2010).

**Tableau 4** : Dose létale 50 de la stérigmatocystine chez différentes espèces animales en fonction de la voie d'administration (Pitt et Hocking, 2009).

<b>Animal</b>	<b>DL50 (mg/kg)</b>	<b>Voie d'administration</b>
Rat	60	Intrapéritonéale
Rat	166	Orale
Souris	32	Intrapéritonéale
Souris	>800	Orale
Poulet	10	Intrapéritonéale
Poulet	41	Orale

### 2.5.3- Les moisissures stérigmatogènes

La STC est une mycotoxine qui produit, principalement, par des espèces appartenant au genre *Aspergillus*, dont les deux principaux producteurs sont *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus versicolor* (Schmidt et *al.*, 1981; Abdel-wahhab et *al.*, 2005).

La liste a été étendue à plusieurs espèces qui appartiennent aux genres : *Aschersonia*, *Bipolaris*, *Botryotrichum*, *Chaetomium*, *Emericella*, *Eurotium*, *Farrowia*, *Fusarium*, *Humicola*, *Moelleriella*, *Monocillium* et *Podospor* (Rank et *al.*, 2011).

#### 2.5.3.1- Genre *Aspergillus*

##### i. Généralité

Les *Aspergillus spp.* sont des moisissures omniprésentes, largement distribuées dans la nature grâce à leur capacité de produire un grand nombre de spores aéroportées et facilement transmissible par le courant d'air, de plus la majorité de ces espèces n'ont pas de besoins nutritionnels particuliers (Bennett, 2010). Les espèces d'*Aspergillus* se développent sur la

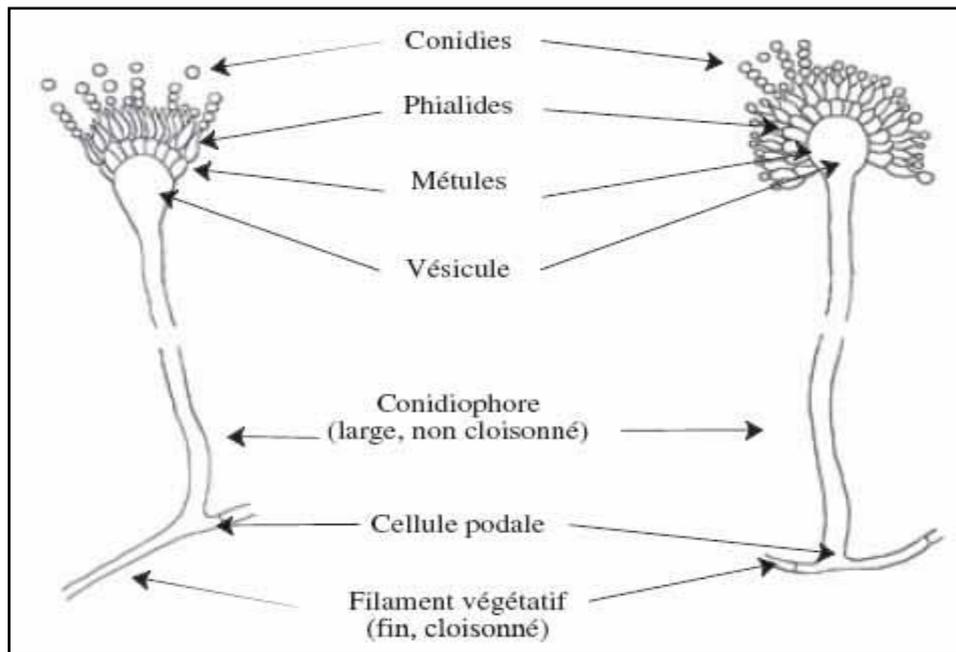
matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires et les céréales (Gugnani, 2003). Ce genre comprend plus de 200 espèces (Bennett, 2009) définies d'après les caractères de l'appareil reproducteur (Botton et al., 1990). Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'homme et les animaux par leur pouvoir d'envahir les tissus vivants et de provoquer des aspergilloses, particulièrement chez les personnes immunodéprimées (Bennett, 2010). De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont aussi connues pour leur capacité à produire des mycotoxines responsables de pathologies animales et humaines (Geiser et al., 2007). Certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes et d'acides organiques (Botton et al., 1990, Ward et al., 2006).

## **ii. Caractères culturels généraux**

Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques (gélose au malt, Sabouraud) additionnés d'antibiotiques. Ils forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses. La couleur des colonies permet une orientation rapide dans l'identification d'espèces: gris-vert pour *A. fumigatus*, vert-jaune pour *A. flavus*, vert foncé à chamois pour *A. nidulans*, chamois clair, jaune et rose pour *A. versicolor*, jaune puis noir pour *A. niger*. Le revers de la colonie est incolore ou jaune, mais il peut brunir ou rougir avec l'âge (Chabasse et al., 2002).

## **iii. Morphologie microscopique**

L'étude microscopique du genre *Aspergillus* a été effectuée pour la première fois par Antonio Micheli, en 1729 (Gugnani, 2003). Ce genre est caractérisé par un appareil végétatif formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés (conidiophores) qui se terminent par une vésicule de forme variable, sur laquelle, sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. Les phialides sont formées soit directement sur la vésicule (têtes conidiennes unisériées) soit portées sur des métules (têtes conidiennes bisériées) (figure 2). Les conidies, sèches, disposées en chaînes divergentes ou associées en colonnes compactes, sont toujours unicellulaires, globuleuses, sub-globuleuses ou elliptiques, lisses ou ornementées, hyalines ou pigmentées en jaune, vert, brun ou noir (Chabasse et al., 2002). Des cellules à paroi épaisse (*Hülle cells*) parfois présentes (Botton et al., 1990).



**Figure 2:** Principaux caractères microscopiques des *Aspergillus* (Chabasse et al., 2002).

#### iv. Téléomorphe

Comme le cas pour le *Penicillium* et le *Fusarium*, la plupart des espèces d'*Aspergillus* ne produisent aucun téléomorphe connu. Ceux qui forment sont classifiés en dix genres d'Ascomycètes (Bennett, 2009). Trois d'entre eux sont très présents dans les aliments : *Eurotium*, *Neosartorya*, et *Emericella*.

Les espèces d'*Emericella* produisent des têtes avec métules et phialides, et des cléistothèces blancs produisant des ascospores rouges ou pourpres. Les cléistothèces sont entourés par les cellules de Hülle (ou les cellules en noisette). Ces dernières sont des formations arrondies, réfringentes à paroi épaisse, accompagnent souvent les formes sexuées, mais que l'on peut également observer isolées. De nombreuses espèces sont isolées principalement ou uniquement à partir de sols désertiques. Une seule espèce est commune dans les aliments en l'occurrence; *Emericella nidulans* (Pitt et Hocking, 2009).

#### 2.5.3.2- *Aspergillus nidulans* (téléomorphe: *Emericella nidulans*)

##### i. Généralité

*Aspergillus nidulans* est un champignon cosmopolite et trouve son principal habitat sur les matériaux à décomposition lente. Bien que n'étant pas particulièrement fréquente dans les

aliments, *A. nidulans* a été isolé à partir d'une grande variété de sources. Les céréales et les produits céréaliers ont été les plus courantes, y compris; le maïs, le blé, la farine, le pain, l'orge, le riz et le sorgho. D'autres sources comprennent les raisins, les noisettes, la viande, le soja, les haricots secs, les grains de poivre, le chocolat et les épices (Pitt et Hocking, 2009). *A. nidulans* est une espèce pathogène aussi bien pour les humains que pour les animaux, provoquant des atteintes des voies respiratoires: aspergilloses broncho-pulmonaires, asthme et alvéolites allergiques.

Selon Kirk et *al.*, 2008, la taxonomie d'*Aspergillus nidulans* suit l'organisation suivante:

<b>Domaine</b>	<i>Eukarya</i>
<b>Reigne</b>	<i>Mycota</i>
<b>Embranchement</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Classe</b>	<i>Eurotiomycetes</i>
<b>Ordre</b>	<i>Eurotiales</i>
<b>Famille</b>	<i>Trichocomaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Aspergillus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Aspergillus nidulans</i>

## ii. Caractères cultureux

Selon Pitt et Hocking (2009), la colonie d'*A. nidulans* se caractérise par:

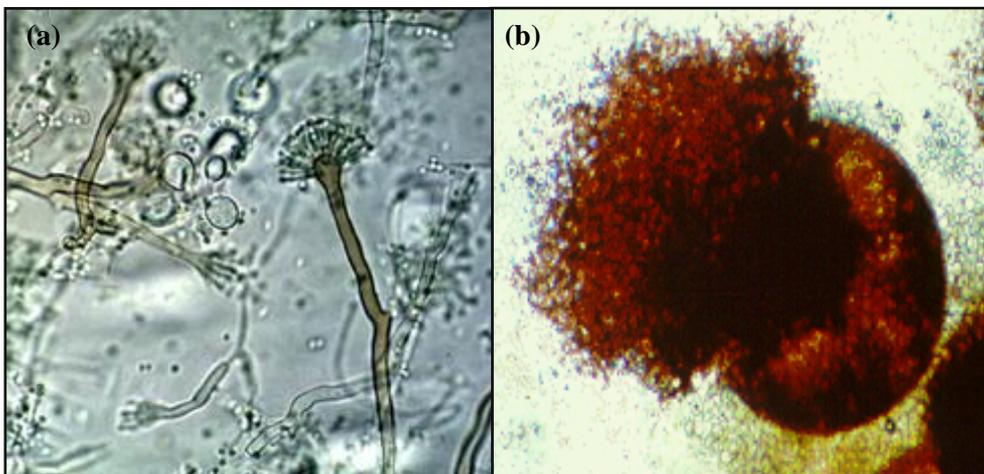
- À 25°C sur le CYA, la colonie a un diamètre de 40-50 mm, plate, basse, plus ou moins dense; le mycélium est blanc; l'exsudat, qui peut exister parfois, est rouge sombre à brun; pigment soluble, une fois produit, est de couleur violète; le revers est parfois pâle, brun orangé, brun foncé ou violet.
- À 25°C sur le MEA, la colonie a un diamètre de 35-60 mm, parfois basse, plate et velouté avec formation abondante des conidies et peu de cléistothèces; mycélium blanc; revers pâle, brun ou violet brun.
- À 25°C les colonies, sur G25N, font de 10-15 mm de diamètre, basse et dense; revers pâle.

- À 37°C les colonies, sur CYA, ont un diamètre de 50 à 70 mm, habituellement prédominance des cléistothèces, parfois avec des zones de couleur vert (conidies); revers généralement de couleur orange ou marron.
- Il est par ailleurs à signaler qu'aucune croissance à 5°C n'est remarquée.

### iii. Morphologie microscopique

Les conidiophores sont très petits (de 70-100 µm de long, ne dépasse pas 300 µm), souvent sinueux, avec des murs lisses et bruns; vésicules hémisphériques portant des métules et des phialides sur la moitié supérieure (tête aspergillaire bisériée); conidies rondes, verte, échinulées, 3,0 à 3,5 µm de diamètre, avec des murs rugueux, souvent disposées en chaînes.

Lors de la reproduction sexuée il y a formation des cléistothèces globuleux, de 100-300 µm de diamètre, brun-orangé à la maturité, renferment des asques globuleux octosporés et entourés par des cellules de Hülle de 10 à 20 µm de diamètre (figure 3). Les ascospores sont rouges à maturité (Chabasse et *al.*, 2002).



**Figure 3:** Observation microscopique d'*Aspergillus nidulans*: (a) Têtes aspergillaires bisériées caractérisées par leur vésicule hémisphérique et conidiophores petits (gx25), (b) Cléistothèces globuleux entourés par des cellules de Hülle (gx10) (Chabasse et *al.*, 2002).

### iv. Biosynthèse de la STC par *Aspergillus nidulans*

*A. nidulans* est un producteur principal de la STC. Il est capable de se développer sous une gamme de température assez large allant de 6 à 48°C, avec une optimale de croissance entre

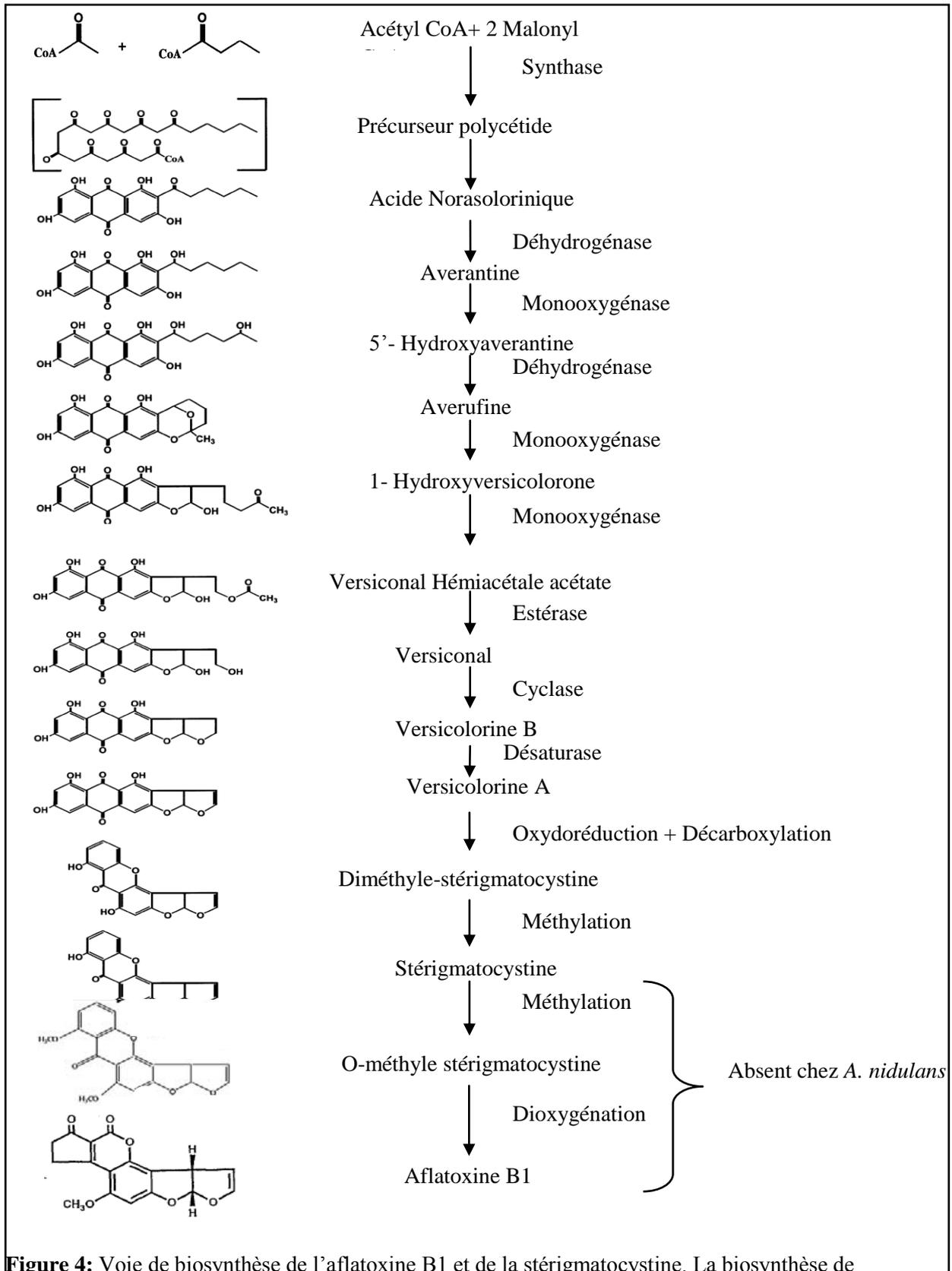
30 et 35°C. L' $a_w$  minimale de la croissance est de 0,78 à 25°C, de sorte que cette espèce est une xérophile. Le pH de croissance est de 3,5 à 9 (Tilburn et al., 1996; MacCabe et al., 2002). Cependant, la biosynthèse de la STC par *A. nidulans* n'a lieu que sous des conditions spécifiques de température (27°C-33°C), de pH (acide) et d'humidité (15%). En plus de ces facteurs, la production de la STC, Chez *A. nidulans*, est couplée à la phase de sporulation (Reverberi et al., 2010). Seulement dans des conditions où la formation des conidies et/ou des cléistothèces a lieu, que la biosynthèse de la STC se déroule à des quantités significatives (Guzmán-de-Peña, 1998). La lumière constitue un régulateur important de ces deux processus. La sporulation d'*A. nidulans* est augmentée à l'obscurité, il réagit à la lumière en formant des conidies asexuées, tandis que dans des conditions sombres, la souche développe préférentiellement des cléistothèces. En effet, la biosynthèse de la STC est augmentée aussi à l'obscurité (Guzmán-de-Peña, 1998; Reverberi et al., 2010).

La STC est une mycotoxine étroitement apparentée à l'AFB1. Chez les espèces productrices de l'AFB1, la STC a été identifiée comme un intermédiaire dans la voie de biosynthèse de cette mycotoxine (figure 4) (Hodges et al., 1994). La conversion de la STC en AFB1 par ces espèces a été démontrée *in vitro* (Rabie et al., 1977). Chez *A. nidulans*, la STC est le produit final de la biosynthèse (Brochard et Le Bâcle, 2009) et il n'y a aucune preuve davantage de conversion en AFB1 (Hodges et al., 1994).

#### **2.5.4- Contrôle de la STC**

Pendant que la STC a été reconnue comme un composé hautement toxique, le département Californien de services de la santé (DHS) a fixé une dose journalière admissible de 8 µg/kg de poids corporel/jour pour un adulte de 70 kg. Aussi, certains pays ont fixé des teneurs maximales admissibles pour la STC dans les denrées alimentaires (exp: les républiques de Slovaquie et Tchèque à des niveaux de 5 µg/kg pour le riz, les légumes, la pomme de terre, la farine, la viande, le lait; et 20µg/kg pour les autres aliments) (Versiloveškis et al., 2008).

Très peu de données sont disponibles concernant la surveillance des denrées alimentaires pour la STC. Une des rares enquêtes en Europe a été réalisée en 1983 au Royaume-Uni, sur 523 échantillons analysés, 17 échantillons (environ 3%) ont été trouvés positifs. Une autre grande enquête a été faite au Brésil, dans la même décennie, où la STC n'a pas été détectée du tout. L'inconvénient de ces enquêtes était que la méthode utilisée a une limite de détection (LOD) relativement élevé (Veršilovskis et al., 2008).



**Figure 4:** Voie de biosynthèse de l'aflatoxine B1 et de la stérigmatocystine. La biosynthèse de

AFB1/STC entamée avec la génération d'un précurseur polycétide et finie par la STC (*A. nidulans*) et AFB1 (*A. flavus* et *A. parasiticus*) (Wilkinson et al., 2004).

Il existe plusieurs méthodes pour la détection de la STC, les méthodes analytiques les plus fréquemment appliquées sont basées sur la chromatographie sur couche mince (CCM) avec détection par fluorescence. En raison de sa faible fluorescence naturelle, une procédure de dérivation est généralement utilisée pour visualiser la STC sur les plaques CCM développées. L'approche de dérivation la plus courante est la pulvérisation de la plaque de CCM avec la solution du chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ), après le développement et le chauffage de la plaque. Avec de telles procédures, il est rapporté que les LOD sont  $50 \mu\text{g/kg}$  et  $140 \mu\text{g/kg}$ , dans des grains de céréale. D'autres méthodes basées sur la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) sont appliquées pour la détermination de la STC. Actuellement, les seules méthodes avec des limites de quantification (LOQ) de STC à des niveaux inférieurs à  $5 \mu\text{g/kg}$  sont basées sur la chromatographie liquide couplée au spectrométrie de masse (LC-MS) et la chromatographie gazeuse couplée au spectrométrie de gaz (GC-MS) (Versiloveškis et *al.*, 2007).

[Tapez un texte]

# Matériel et Méthodes

### **3- Matériel et Méthodes**

#### **3.1- Échantillonnage**

Le travail consiste en l'isolement de la mycoflore des grains de maïs commercialisé au niveau de la Wilaya de Constantine, Est Algérien, pour sélectionner une souche potentiellement stérigmatogène.

Pour rappel, trois échantillons de maïs ont été prélevés aléatoirement d'un lot d'importation, vendus sans emballage adéquat et exposés à un environnement chaud et humide.

L'échantillonnage est effectué le mois de mars 2011, suivant la technique de Vytřasová et *al.* (2002) qui consiste en la prise de 500g de chaque lot de grains de maïs prélevé, au hasard, à l'aide d'une cuillère stérile. Les échantillons sont, ensuite, placés dans des sacs en polyéthylène stériles et scellés puis transférés immédiatement au laboratoire et maintenus à 4°C jusqu'à l'analyse mycologique (El-Shanawany et *al.*, 2005).

#### **3.2- Mesure du taux d'humidité**

La mesure de l'humidité de l'échantillon a été effectuée sur une prise d'essai de 30g, broyée, pesée et mise dans une étuve réglée à 130°C pendant 4 heures. Après étuvage, la prise d'essai est refroidie dans un dessiccateur pendant 30 min et pesée jusqu'à l'atteindre de poids sec. L'humidité (H%) est calculée par la différence des masses de prise avant et après séchage (Tahani et *al.*, 2008).

#### **3.3- Analyse mycologique**

##### **3.3.1- Triage des grains**

Le tri se fait en fonction de la taille, la couleur et l'aspect des grains: tout changement de taille, de couleur ou d'aspect général des grains permet de suspecter leur contamination intérieure.

##### **3.3.2- Désinfection de la surface des grains**

Cent grains de chaque échantillon de maïs sont désinfectés en surface dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1%, pendant une minute. Après deux rinçage à l'eau distillée

stérile, les grains sont séchés avec du papier filtre stérile pour être, ensuite, ensemencés (Pacin et *al.*, 2002 ; Ghiasian et *al.*, 2004).

### **3.3.3- Isolement des mycètes**

Les grains désinfectés sont ensemencés par la technique SFP (*filter paper soaked with NaCl solution*). Cette méthode a été proposée par Mills et *al.* (1978) pour isoler les moisissures de détérioration des aliments.

Sous des conditions aseptiques, les grains désinfectés sont placés directement, à l'aide d'une pince stérile, dans des boîtes de Pétri contenant du papier filtre stérile, imbibé avec 5,5 ml d'une solution aqueuse de chlorure de sodium à 7,5%, stérilisée au préalable, à raison de dix grains par boîte. L'ensemble est incubé à 27°C pendant 4 à 6 jours.

### **3.3.4- Purification des isolats**

Des observations quotidiennes sont effectuées dès la germination des grains et l'apparition de mycélium. Chaque mycélium développé est repiqué, à l'aide d'un fil de platine stérile, au centre de boîte de Pétri contenant un milieu PDA neuf (annexe2), additionné de chlorotétracycline (30 mg/l), puis incubé à 27°C pendant 6 jours. En cas de contamination par autre souche fongique, la purification des souches est effectuée par le repiquage d'un hyphes terminal au centre de boîte contenant le même milieu et dans les mêmes conditions d'incubation jusqu'à l'obtention de souches pures (Guiraud, 2003).

### **3.3.5- Conservation des isolats**

Les souches pures obtenues sont conservées selon deux méthodes : la méthode de gélose inclinée et la méthode de congélation.

#### **3.3.5.1- Gélose inclinée**

Les souches fongiques purifiées sont repiquées sur milieu PDA incliné. Après incubation à 30°C pendant 7 jours, les souches sont stockées à 4°C et un repiquage est réalisé tous les deux mois (Takahashi et *al.*, 2008).

### **3.3.5.2- Congélation des cultures sporulées**

Les souches fongiques purifiées sont ensemencées sur milieu gélosé (PDA), puis incubées jusqu' à sporulation, une suspension de spores est préparée par raclage de la surface de culture puis conservée à – 20°C en présence du glycérol à 20% (Isik *et al.*, 1999).

### **3.3.6- Identification des isolats**

#### **3.3.6.1- Identification des genres**

L'identification des genres de moisissures repose sur :

-Des caractères cultureux (macroscopiques): vitesse de croissance, couleur de colonie, couleur de l'envers de colonie, etc. (Chabasse *et al.*, 2002).

-Des caractères microscopiques : hyphes cloisonnés ou non, type et apparence du système sporal, caractéristiques de la spore asexuée (couleur, taille, septation), etc. (Guiraud, 2003).

Les isolats sont examinés au microscope en tant que frottis humides. Pour préparer un frottis humide, une aiguille d'inoculation est utilisée pour récupérer une petite partie de la colonie comportant les structures conidiogènes. L'échantillon est prélevé sur la bordure de la colonie car les structures fertiles sont jeunes et le nombre de spores n'est pas excessif. Une goutte de lactophénol est ajoutée à la préparation qui est recouverte délicatement d'une lamelle (Nguymen, 2007). En outre, l'utilisation d'un microscope à fluorescence a permis la prise en photo du mycélium.

Les isolats fongiques sont identifiés selon le manuel de Botton *et al.* (1990).

#### **3.3.6.2- Identification des espèces**

Les espèces appartenant au genre *Aspergillus* sont identifiées sur trois milieux différents CYA, MEA et G25N (Annexe2) à 25°C et CYA à 5 et 37°C pendant 7 jours. Les boîtes incubées à 37°C doivent être enfermées dans des sacs en polyéthylène pour empêcher l'évaporation et l'assèchement du milieu (Pitt et Hocking, 2009). Tous les milieux sont inoculés selon le schéma décrit dans la figure 5.

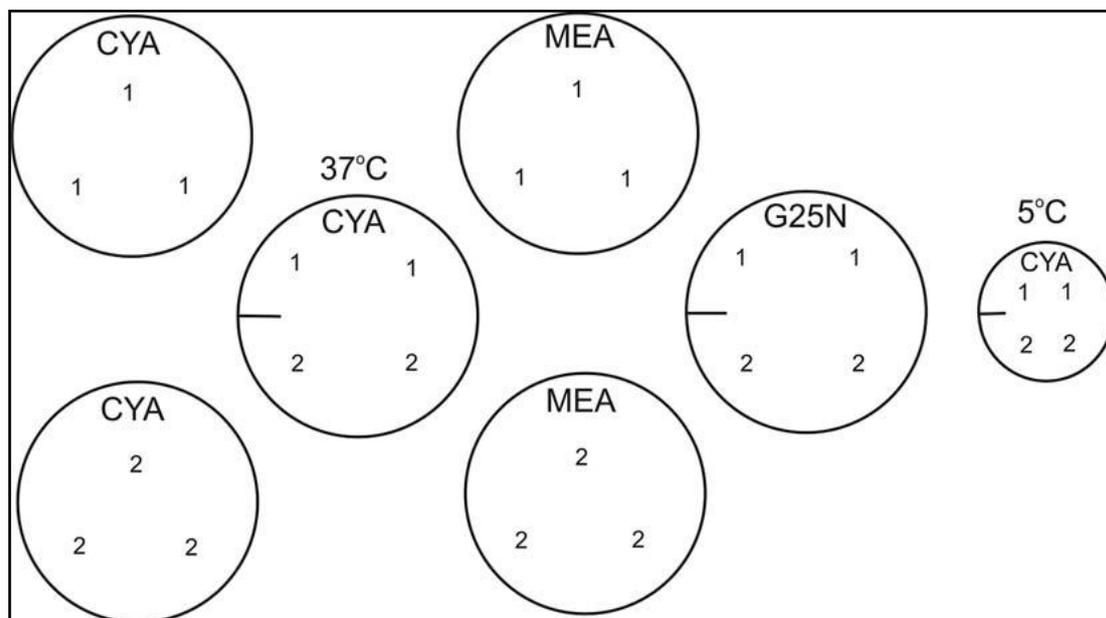
Après 7 jours d'incubation, l'identification est fondue sur les caractères suivants:

-Diamètres de la colonie : Les diamètres des colonies sont mesurés en millimètres sur le fond de la boîte.

-Caractères de colonie : L'aspect de la colonie est examiné à l'œil nu ou sous une loupe.

-Observation microscopique : Tête aspergillaire (unisériée, bisériée), forme de vésicule, conidies (forme, couleur), etc. L'observation microscopique est réalisée aux grossissements x25 et x40.

L'identification est réalisée suivant les recommandations de Pitt et Hocking, 2009.



**Figure 5:** Schéma de culture des isolats fongiques (souche 1 et 2) destinés à leur identification (Pitt et Hocking, 2009).

### **3.4- Recherche de la stérigmatocystine dans les échantillons de maïs**

Pour détecter la contamination des échantillons de maïs par la STC, une analyse de celle-ci dans les échantillons de maïs a été réalisée. Les aspects majeurs de l'analyse comprennent l'extraction de la STC, à partir de la matrice, puis la détection qualitative de celle-ci par CCM (figure 6).

### **3.4.1- Extraction de la STC à partir des grains de maïs**

Cinquante grammes de maïs finement broyés sont mixés avec 200 ml de solvant d'extraction composé d'acétonitrile/eau (9/1v/v) (l'eau contient 4% de chlorure de potassium). Le mélange, disposé dans un erlenmeyer de 500 ml, est agité sur un agitateur rotatif pendant trente minutes, puis filtré sur papier filtre Wattman n°1 (Abdel-Wahhab *et al.*, 2005).

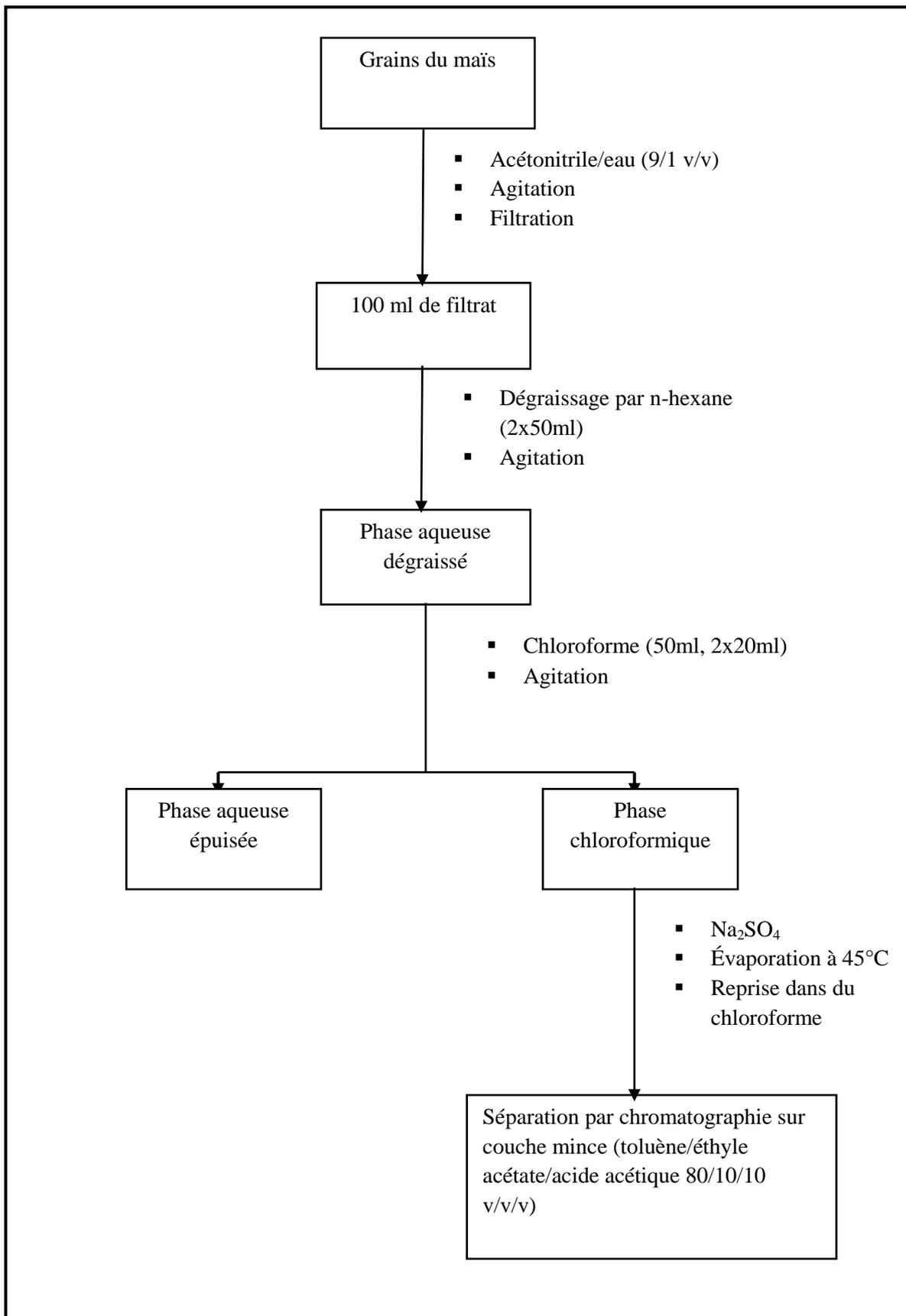
Un aliquote de 100 ml du filtrat obtenu est dégraissé à deux reprises par addition de 50 ml de l'hexane. L'eau distillée (25 ml) y est ajoutée. Cette solution est extraite par le chloroforme trois fois (50 ml puis 2x20ml). L'ensemble des extraits chloroformiques réunis sont déshydratés à l'aide de l'anhydride de sulfate de sodium, puis évaporés sous vide dans un évaporateur rotatif à 40°C. Une fois sec, l'extrait est remis en suspension dans 500µl de chloroforme, placé dans un flacon en verre parafilmé et conservé à -20°C pour des analyses ultérieurs par CCM (Gengan *et al.*, 1999).

### **3.4.2- Détection de la STC par CCM**

La chromatographie analytique a été utilisée pour vérifier la présence de la STC dans l'extrait. Des plaques de CCM prêtes à l'emploi, de gel de silice 60F – Merck sur support d'aluminium de marque Macherey-Nagel avec des dimensions 20 x 20 cm ont été utilisées. La phase mobile est constituée de toluène/éthyle acétate/acide acétique (80 /10/10 v/v/v) (Kato *et al.*, 2003, Seo *et al.*, 2003).

Dix microlitre de chaque extrait, dissout dans le chloroforme, sont déposés à l'aide d'une micropipette sur la plaque, préalablement activée dans une étuve à 80°C pendant 2 heures (Hitokoto *et al.*, 1982), à 1 cm du bord inférieur sur la ligne de base. La plaque est ensuite, mise dans la chambre de migration contenant la phase mobile.

Après séchage de la plaque, la révélation des taches est effectuée en exposant la plaque sous lumière UV à une longueur d'onde de 365 nm où les taches correspondant à la STC donnent une fluorescence rouge brique (Yu et Leonard, 1995). La visualisation de la STC est accrue par pulvérisation d'une solution de chlorure d'ammonium à 20 % dans l'éthanol, suivie de chauffage à 80 °C pendant 10 mn (Hicks *et al.*, 1997; Engelhart *et al.*, 2002). Après cette étape les spots de STC sont visualisés sous lumière UV comme des taches de couleur jaune fluorescente (Yu et Leonard, 1995; Kelkar *et al.*, 1996).



**Figure 6:** Schéma de l'extraction et la séparation de la STC à partir des grains de maïs.

### **3.5- Production de la STC par l'isolat**

La production de la STC par la souche isolée est mise en évidence par une extraction et purification de celle-ci à partir d'une culture de fermentation, suivie par la détection qualitative de la STC par chromatographie sur couche mince (CCM) (figure 7).

#### **3.5.1- Préparation du milieu de fermentation**

Le milieu YES est choisi comme un milieu spécifique pour une production optimale des mycotoxines (Rojas et *al.*, 2005, Pamel et *al.*, 2010). Il est composé, selon Frisvad et Filtenborg (1983), en (g/l) de : (20) extrait de levure, (150) sucrose, (0,5)  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , (0,01)  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , (0,005)  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ .

La fermentation est réalisée dans des erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml du milieu de culture (YES) et pH ajusté à 5,5 (Tuomi et *al.*, 2001). La stérilisation du milieu se fait à 121°C pendant 20 min.

#### **3.5.2- Ensemencement du milieu de fermentation**

La souche identifiée est ensemencée en surface dans des erlenmeyer de 250 ml contenant 30ml de PDA gélosé. Après 10 jours d'incubation à 25°C, la souche étudiée sporule et ses spores sont récupérées par ajout de 10 ml d'eau distillée stérile suivie d'une agitation vigoureuse à l'aide d'un barreau magnétique (Rabie et *al.*, 1977). La suspension sporale obtenue est diluée avec de l'eau distillée stérile. Ensuite, la concentration en spores/ml de la solution obtenue est déterminée à l'aide d'une cellule de Thomas. Des dilutions décimales sont effectuées pour obtenir une suspension sporale à  $10^6$  spore/ml (Klich et *al.*, 2000; Seo et *al.*, 2003; Ehrlich et *al.*, 2005).

Chaque erlenmeyer contenant le milieu de culture est inoculée par 1 ml de la suspension sporale ( $10^6$  spore/ml). Les erlenmeyer sont incubés en statique à 28°C, pendant 15 jours et à l'obscurité (Chung et *al.*, 1989; Barnes et *al.*, 1994 ; Klich et *al.*, 2001).

Des prélèvements sont effectués périodiquement tous les vingt quatre heures pour déterminer la biomasse qui correspond au poids sec du mycélium. Pour ce faire, l'échantillon est filtré sur papier Whattman n°1 puis le mycélium est transféré à une boîte de Pétri, lavé avec 10 ml d'eau distillée et secoué doucement pour libérer les spores. Cette opération est répétée deux

fois. Ensuite le mycélium est séché à 105°C pendant 24 heures, conservé à température ambiante dans un dessiccateur pendant 24 heures, et enfin le mycélium sec est pesé (Delgado-Virgen et Guzman-de-Peña, 2009).

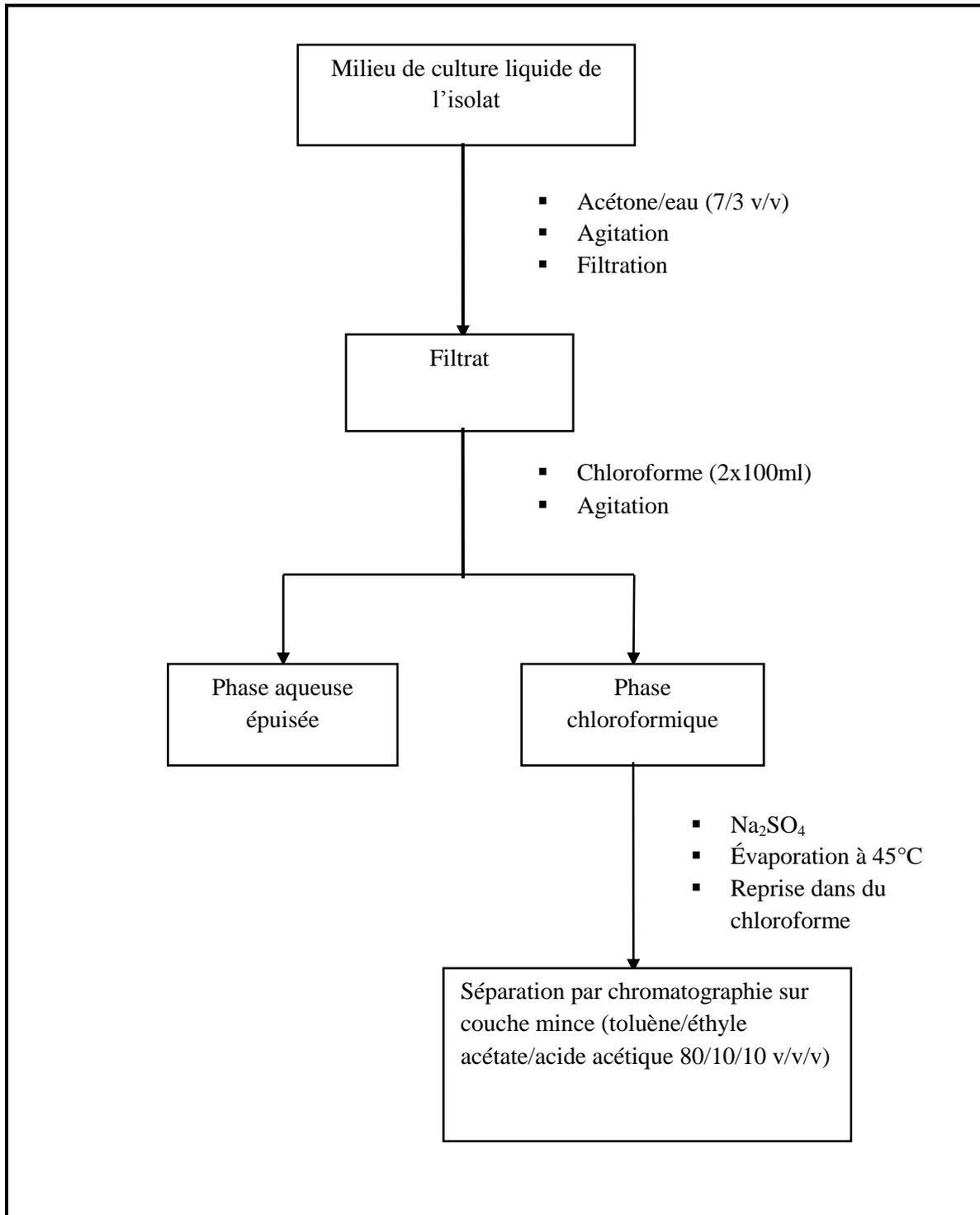
### **3.5.3- Extraction de la STC à partir du milieu de fermentation**

Après fermentation de la souche fongique sélectionnée dans le milieu YES, comme décrit ci-dessus, le contenu de chaque erlenmeyer est mixé avec 100 ml de solvant d'extraction composé d'acétone/eau (7/3 v/v). Le mélange, disposé dans un erlenmeyer de 500 ml est agité pendant trente minutes à l'aide d'un agitateur magnétique, puis filtré sur papier filtre Wattman n°1.

Après filtration, la STC est extraite par le chloroforme deux fois (100 ml). L'ensemble des extraits chloroformiques réunis sont déshydratés à l'aide de sulfate de sodium anhydre (Kelkar et *al.*, 1996; Gengan et *al.*, 1999), puis évaporés (sous vide) dans des ballons à fond conique de 50 ml baignant dans un bain marie à 45 °C. Une fois sec, l'extrait est remis en suspension dans 500µl de chloroforme et placé dans un flacon en verre parafilmé pour des analyses ultérieures par CCM (Gengan et *al.*, 1999).

### **3.5.4- Détection de la STC par CCM**

La chromatographie analytique a été utilisée pour vérifier la présence de la STC dans l'extrait, comme il a été déjà décrit dans le paragraphe 3.4.2.



**Figure 7:** Schéma de l'extraction et la séparation de la STC à partir de milieu de fermentation liquide.

### **3.6- Étude de la toxicité subaigüe de la STC *in vivo***

#### **3.6.1- Animaux de l'expérience**

L'étude de la toxicité subaigüe de la STC a été réalisée avec un échantillon de 12 rats, femelles, de type *Wistar albinos*, âgés de 3 mois et pesant 190 - 200 g, fournis par l'animalerie de Département de Biologie Animale à l'Université de Constantine. Les rats sont logés dans des cages en polyéthylène et tapissées d'une litière composée de copeaux de bois. Ils sont stabulés dans les conditions standards d'éclairage et de température (temps d'éclairage de 12 H par jour, température moyenne de 25°C). L'alimentation et l'eau sont fournies *ad libitum* (El-Agamy, 2010, Oryan et *al.*, 2011).

#### **3.6.2- Répartition des rats**

Les rats sont répartis en deux lots de six.

**Lot 1:** Représente le lot contrôle qui reçoit 2 ml/kg d'huile de germe de blé.

**Lot 2:** Représente le lot traité qui reçoit 20 mg/ kg de STC dissout dans l'huile de germe de blé.

Les animaux sont traités chaque jour pendant deux semaines, donc le groupe des rats injectés par la STC reçoit une dose cumulative de 280mg/kg, par voie intra péritonéale (VI). Le régime alimentaire des rats a été conservé.

#### **3.6.3- Évolution de poids corporel des rats**

L'évolution de poids des rats des différents groupes est contrôlée dès le premier jour du traitement jusqu'à la fin de la période du traitement. Il est impératif d'ajuster les doses de traitement pour les lots chaque semaine, selon le changement du poids afin de maintenir la même dose par kilogramme du poids corporel. Un examen physique est réalisé quotidiennement pour noter les symptômes cliniques.

#### **3.6.4- Sacrifice des animaux**

À la fin de la période du traitement, les animaux sont mis à jeun vingt quatre heures avant les manipulations. Après le prélèvement sanguin, les rats sont sacrifiés par dislocation cervicale,

puis l'autopsie a été effectuée pour prélever le foie. Les foies ont été rincés avec l'eau physiologique froide, séchés avec du papier filtre et pesés, puis ils sont immédiatement fixés dans une solution de formol 10% pour l'analyse histologique (Sĩ- Trung, 2005).

### **3.6.5- Prélèvement sanguin**

Le prélèvement du sang est effectué, à l'aide d'un tube capillaire d'hématocrite, à travers le sinus rétro-orbital au niveau de la veine orbitale des rats anesthésiés par l'éther. Le recueil du sang a été effectué sur tube hépariné. Les tubes héparinés sont centrifugés à 6000 tours/min pendant 15min, le sérum est séparé puis stocké à -20°C jusqu'à l'utilisation pour l'analyse des paramètres biochimiques.

### **3.6.6- Dosage des transaminases**

L'analyse des paramètres sériques a été effectuée par un auto-analyseur (Architect Abbott ci 8200). Les paramètres biochimiques sériques analysés sont l'Alanine aminotransférase (ALAT) et l'Aspartate aminotransférase (ASAT).

Le dosage biochimique est effectué au laboratoire de Biochimie du CHU de Constantine.

#### **3.6.6.1- Principe de la réaction des transaminases**

ASAT et ALAT catalysent le transfert des groupes d'alpha-aminés de l'acide aspartique ou de l'alanine sur le groupe alpha-cétonique de l'acide céto-glutarique afin de produire l'acide oxaloacétique et de l'acide pyruvique. L'activité des transaminases est proportionnelle à la quantité de l'oxalate ou le pyruvate formé dans une période de temps définie et mesurée par une réaction avec 2,4-Dinitrophényldrazine (DNPH) dans un milieu alcalin.

### **3.6.7- Étude Histologique du foie**

Elle comporte une observation macroscopique de foies entiers et un examen microscopique de coupes de foies des animaux expérimentaux.

Les coupes histologiques ont été préparées selon un protocole classique :

Les prélèvements sont fixés dans le formol 10% pendant 2 à 5 jours. Après fixation ils sont découpés, avec une lame de rasoir, en petits bouts de 5 mm d'épaisseur environ, placés dans

des cassettes portant l'identification du prélèvement. La déshydratation des prélèvements consiste en des passages successifs des cassettes dans des solutions d'alcools à concentration croissante, puis les prélèvements subissent un éclaircissement par le xylène. Les prélèvements sont ensuite, inclus dans un bain de paraffine fondue pendant deux heures. La paraffine pénètre peu à peu dans les tissus en remplaçant le solvant. Après la saturation des pièces par la paraffine fondue, l'inclusion définitive dans de petits moules à fond plat ait lieu. Ces derniers servent à donner la forme du bloc. Le bloc peut se conserver pendant des années sans aucun dommage ni affectation. Le bloc solide de paraffine contenant le tissu est coupé à l'aide d'un microtome permettant de réaliser des coupes de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Les coupes obtenues sont étalées et collées sur des lames, puis séchées dans une étuve pendant une nuit. Elles sont ensuite colorées par une solution d'hématoxyline-éosine (Aarab, 2004).

Les coupes sont observées au microscope optique à différents grossissements.

Ces coupes histologiques sont réalisées au laboratoire d'anatomopathologique du CHU de Batna.

### **3.6.8- Analyse statistique des résultats**

Tous les résultats sont présentés sous la forme de moyenne  $\pm$  SD (déviation standard). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS, en utilisant le test de Student.

Ce test nous donne le degré de signification P où est conclue que la différence :

- N'est pas significative si  $p > 0,05$  (NS).
- Est significative si  $0,05 > p > 0,01$  (\*).
- Est hautement significative si  $0,05 > p > 0,01$  (\*\*).
- Est très hautement significative si  $p < 0,001$  (\*\*\*)).

# Résultats et Discussion

## **4- Résultats et Discussion**

Le maïs est parmi les produits de nécessité pour la nutrition humaine et animale. En revanche, il présente un risque élevé de contamination par les moisissures. Plusieurs autorités, de par le monde, ont préconisé que le maïs forme une source de maladie nutritionnelle liée, surtout, à la consommation du produit contaminé par des champignons susceptibles de produire de mycotoxines (Dutton, 2009).

D'après les recherches bibliographiques qui ont été réalisées au cours de ce travail, aucune donnée n'est disponible, ni sur la contamination fongique du maïs importé en Algérie, ni sur la capacité des souches contaminants à produire la STC. De ce fait, l'approche développée dans cette étude repose essentiellement, d'une part, sur l'analyse mycologique du maïs importé et commercialisé dans la région de Constantine, lieu du prélèvement d'échantillons, et la sélection d'une souche potentiellement stérigmatogène et, d'autre part, sur l'étude, *in vivo*, de l'effet toxique de la STC produite par fermentation.

### **4.1- Mesure du taux d'humidité**

L'analyse de taux d'humidité a permis d'enregistrer une moyenne égale à 12,63%, taux jugé élevé, qui peut être dû au transport maritime du maïs, aux conditions climatiques des pays d'exportation ou alors, aux conditions de stockage chez les deux parties.

La teneur en humidité du substrat est responsable de plusieurs phénomènes d'altération biologique de l'aliment, notamment mycologique (Belli et *al.*, 2004). Les moisissures de stockage sont capables de croître sur des substrats contenant 10 à 18% d'humidité, avec un optimum de croissance compris entre 11 et 13 % (Gacem et *al.*, 2011), ce qui justifie largement la forte contamination fongique des échantillons étudiés, constatée ci-après.

### **4.2- Analyse mycologique**

#### **4.2.1 - Isolement et identification des mycètes**

Un nombre total de 133 isolats de moisissures a été isolé à partir des trois échantillons de maïs analysés. Les études macroscopiques et microscopiques ont permis de mettre en évidence six

genres fongiques (figure 8), présentés dans l'ordre décroissant de prédominance comme suit: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Alternaria* et *Mucor*.

L'*Aspergillus* est le genre majoritaire avec une fréquence de 53,38% des souches isolées, représenté par huit espèces : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus sp.1*, *Aspergillus sp.2*, *Aspergillus sp.3*, *Aspergillus sp.4* et *Aspergillus sp.5*. Vient ensuite, le genre *Fusarium* qui représente 23,31% de l'ensemble des isolats regroupant trois espèces: *Fusarium sp.1*, *Fusarium sp.2* et *Fusarium sp.3*, suivi par le genre *Penicillium* avec une fréquence de 17,29%, représenté par quatre isolats (*Penicillium sp.1*, *Penicillium sp.2*, *Penicillium sp.3* et *Penicillium sp.4*). Les genres *Rhizopus*, *Alternaria* (*Alternaria sp.1*, *Alternaria sp.2*) et *Mucor* représentent respectivement 2,26; 2,26 et 1,50% de l'ensemble des souches isolées.

L'analyse mycologique des échantillons de maïs révèle la similitude de la mycoflore globale de tous les échantillons et que la prévalence de chaque espèce est faiblement variée (tableau5).

La prédominance du genre *Aspergillus* dans la flore contaminant les céréales est mise en évidence dans les études réalisées par Riba *et al.* (2008), Gacem *et al.* (2011), en Algérie, et par Tahani *et al.* (2008) au Maroc. Par ailleurs, Tabuc (2007) et Sreenivasa *et al.*, (2011) confirment que le genre *Aspergillus* est le contaminant majeur du maïs. Cependant, Baath *et al.*, (1990) ont montré que les espèces appartenant au genre *Fusarium* ont été les plus dominantes dans la mycoflore isolée à partir du maïs stocké. En revanche, Skrinjar *et al.* (1992) et Gonzalez *et al.* (1995) ont rapportés que les *Penicillium spp.* ont été les plus fréquemment isolés à partir du maïs stocké.

Les espèces des genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont connues comme des moisissures de stockage (Moreno *et al.*, 2009, Makun *et al.*, 2007); selon Riba *et al.*, (2008), le manque de ventilation couplé à une température élevée, favorise la croissance de ces espèces xérotolérantes. Cependant, la forte humidité défavorise, plutôt, la croissance des *Penicillium* en faveur de celle des *Aspergillus* qui les dominent. De plus, le taux de contamination par le genre *Penicillium* est inversement proportionnel à la durée de stockage ce qui explique la dominance du genre *Aspergillus*, vraisemblablement, favorisée par une humidité élevée du grain et un stockage de longue période (Tahani *et al.*, 2008).

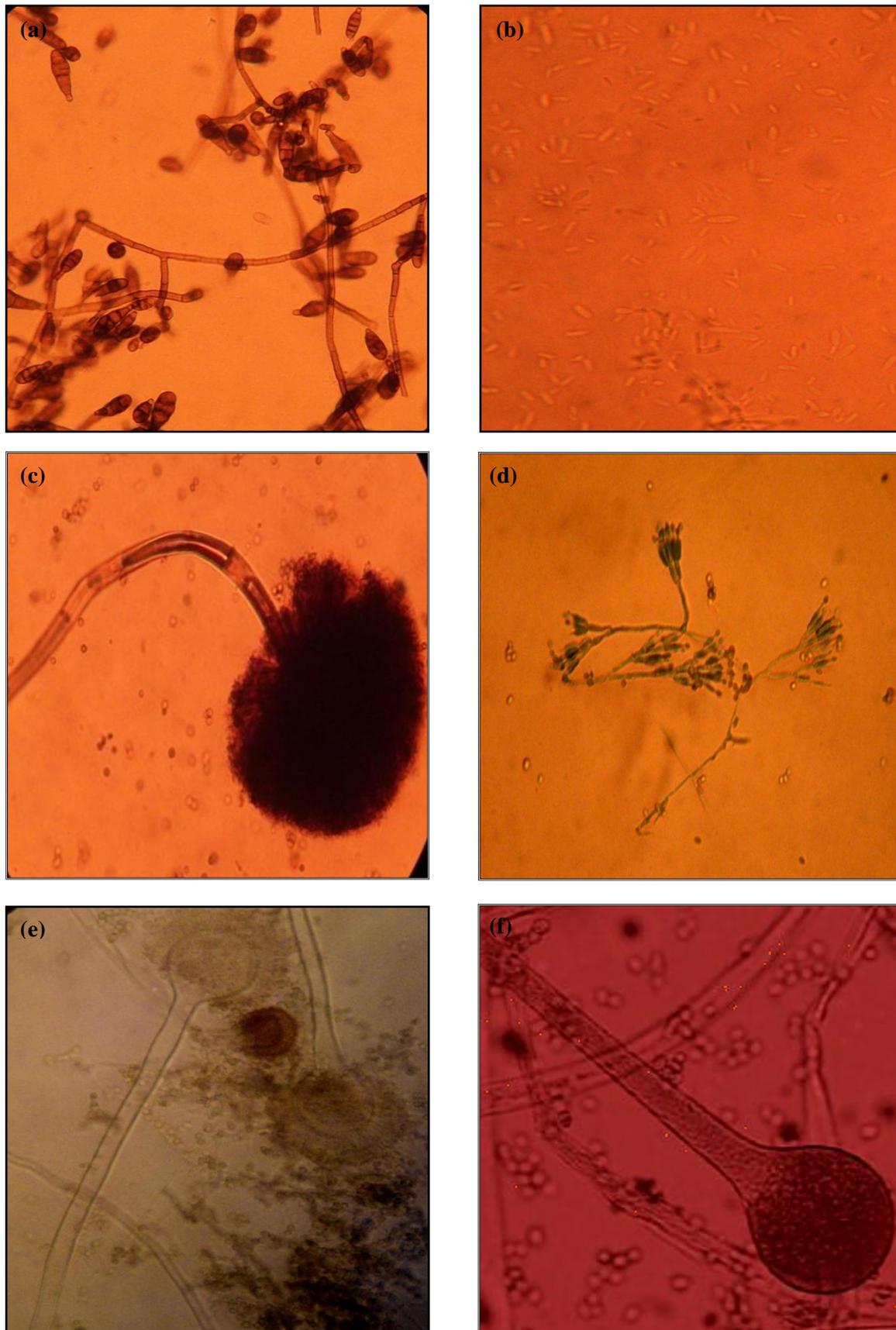
Parmi les espèces fongiques appartenant au genre *Aspergillus*, il a été constaté la grande prévalence de l'*Aspergillus flavus* (53,52% de l'ensemble des *Aspergillus* isolés) suivi par *A. niger* (14,08%), mais aussi, la présence d'*Aspergillus nidulans*. Ce résultat corrobore ceux rapportés par Sinha *et al.* (2001), Kaaya *et al.* (2006), Magnoli *et al.* (2006) et Sreenivasa *et al.* (2011), qui ont montré que les deux premières espèces sont particulièrement des contaminants majeurs du maïs avec une prédominance alternée suivant les conditions de stockage.

En outre, les résultats de l'analyse de la flore fongique du maïs ont aussi révélé la présence fréquente des espèces appartenant au genre *Fusarium*, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Isebaert *et al.* (2005) qui ont isolé plusieurs espèces de *Fusarium* à partir du maïs. Les espèces de *Fusarium* sont, principalement, considérées comme des moisissures de champs qui exigent des teneurs d'eau et d'humidité relative élevés donc, elles ne sont pas compétitives dans des conditions de stockage (Makun *et al.*, 2007). Cependant, certaines espèces peuvent persister en grand nombre dans le maïs stocké (Pitt et Hocking, 2009).

Les autres souches isolées appartenant aux genres *Rhizopus*, *Alternaria* et *Mucor* sont naturellement présentes sur les cultures en plein champs et dans le sol. La persistance de ces genres dans le maïs semble être due à l'humidité élevée lors du stockage (Gacem *et al.*, 2011).

D'un point de vue mycotoxicologique, quatre parmi les six genres isolés sont potentiellement toxigènes. Les souches appartenant à ces genres peuvent synthétiser différentes mycotoxines : des aflatoxines et de la stérigmatocystine par les *Aspergillus*, de l'ochratoxine A produite par les *Aspergillus* et *Penicillium* (Jorgensen *et al.* 1996), des fumonisines par *Fusarium*, de la citrinine et d'autres toxines moins connues produites par *Alternaria* et *Aspergillus* (Weidenbörner *et al.* 2000).

Il est à signaler qu'un des résultats importants et qui forme un socle à la suite de cette recherche est la présence d'*Aspergillus nidulans* parmi les isolats obtenus comme indiqué précédemment, souche considérée comme productrice principale de la stérigmatocystine. En outre, la présence simultanée d'*A. nidulans* et d'*A. flavus* constitue un risque supplémentaire de contamination en AFB1.



**Figure 8:** Moisissures isolées des échantillons de maïs observées au microscope optique (g  $\times$ 40):  
(a) *Alternaria* sp.; (b) *Fusarium* sp.; (c) *Aspergillus niger*; (d) *Penicillium* sp.  
(e) *Aspergillus flavus*; (f) *Rhizopus* sp.

**Tableau 5:** Isolats fongiques obtenus des trois échantillons de grains de maïs.

Espèces isolées	Nombre d'isolats		
	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3
<b><i>Aspergillus spp.</i></b>	<b>27</b>	<b>23</b>	<b>21</b>
<i>A. flavus</i>	15	13	10
<i>A. niger</i>	04	03	03
<i>A. nidulans</i>	01	00	00
<i>Aspergillus sp.1</i>	03	03	03
<i>Aspergillus sp.2</i>	02	03	02
<i>Aspergillus sp.3</i>	02	01	00
<i>Aspergillus sp.4</i>	00	00	02
<i>Aspergillus sp.5</i>	00	00	01
<b><i>Fusarium spp.</i></b>	<b>12</b>	<b>09</b>	<b>10</b>
<i>Fusarium sp.1</i>	07	05	08
<i>Fusarium sp.2</i>	03	02	02
<i>Fusarium sp.3</i>	02	02	00
<b><i>Penicillium spp.</i></b>	<b>07</b>	<b>07</b>	<b>09</b>
<i>Penicillium sp.1</i>	02	04	03
<i>Penicillium sp.2</i>	03	02	03
<i>Penicillium sp.3</i>	01	01	02
<i>Penicillium sp.4</i>	01	00	01
<b><i>Alternaria spp.</i></b>	<b>02</b>	<b>01</b>	<b>00</b>
<i>Alternaria sp.1</i>	01	01	00
<i>Alternaria sp.2</i>	01	00	00
<b><i>Rhizopus spp.</i></b>	<b>01</b>	<b>01</b>	<b>01</b>
<b><i>Mucor spp.</i></b>	<b>00</b>	<b>01</b>	<b>01</b>
<b>Total</b>	<b>49</b>	<b>42</b>	<b>42</b>

#### 4.2.2- Étude morphologique de la souche sélectionnée

Cette étude repose sur deux aspects; l'aspect macroscopique et l'aspect microscopique.

##### 4.2.2.1- Aspect macroscopique

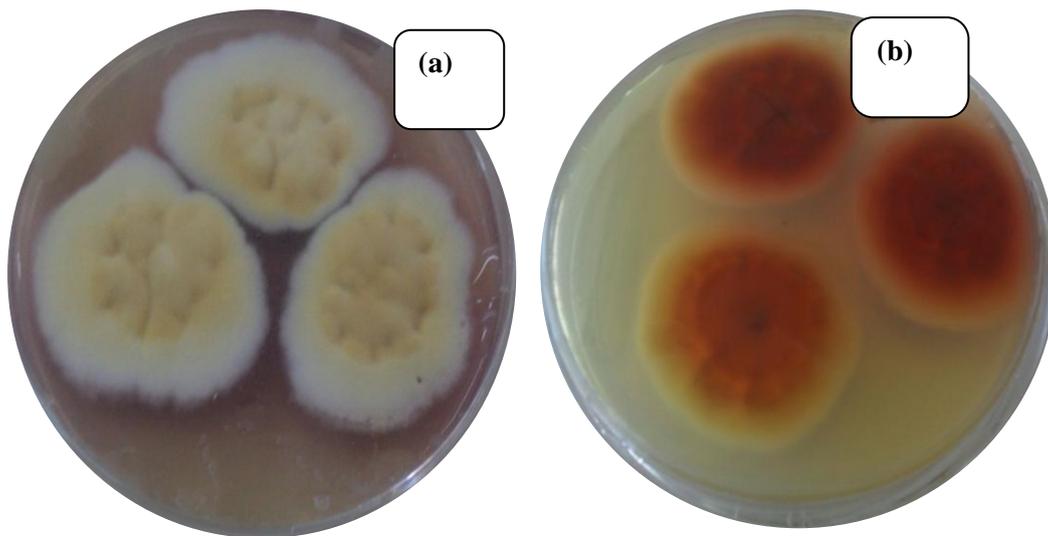
L'étude macroscopique de la souche sélectionnée est réalisée à l'œil nu après 7 jours d'incubation, sur trois milieux différents et à trois température distinctes.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 6 et l'aspect des colonies est représenté par la figure 9.

**Tableau 6:** Caractères macroscopiques de la souche *Aspergillus nidulans*.

Température (°C)	Milieu de culture	Diamètre (mm)	Aspect
25	CYA	43	Colonie de couleur jaunâtre, revers brun orangé, présence de pigments soluble de couleur violette.
	MEA	36	Colonie de couleur blanchâtre, revers brun, absence de pigment soluble.
	G25N	11,7	Colonie de couleur vert pâle et revers marron.
37	CYA	47	Colonie de couleur jaunâtre, revers brun orangé.
5	CYA	00	Pas de croissance

L'absence de croissance à 5°C est un élément important qui confirme une appartenance pratiquement confirmée de l'isolat à *Aspergillus nidulans*.



**Figure 9:** Aspect des colonies de la souche *A. nidulans* sur le milieu CYA à 37°C: (a) face, (b) revers.

#### 4.2.2.2- Aspect microscopique

L'étude microscopique de l'isolat sélectionnée a permis d'observer un mycélium cloisonné, une tête aspergillaire constituée d'une vésicule hémisphérique, sur laquelle sont formées les phialides portés sur des métules (tête bisériée), chaque phialide produit des conidies rondes, échinulées et de couleur verte. Les têtes aspergillaires sont portées sur des conidiophores bruns, sinueux, non ramifié et courts (figure 10).

D'après Pitt et Hocking (2009), l'ensemble de ces caractères (macroscopiques et microscopiques) confirment que la souche isolée est *Aspergillus nidulans*.

L'identification de la forme téléomorphe d'*Aspergillus nidulans* en l'occurrence *Emericella nidulans* par l'observation microscopique a révélé que l'isolat se caractérise par la présence des **Cléistothèces** globuleux, de couleur rouge foncé, renferment de nombreux asques globuleux et entourés par des cellules en noisette (les cellules de Hülle), les ascospores de couleur rouge présentent deux crêtes équatoriales (figure 11). Aspects caractérisant la forme sexuée de la souche et confirme l'appartenance de l'isolat. Ces observations sont en parfaites concordance avec celles constatées par Botton *et al.*, (1990), Erikson et Hawksworth, (1998) et Pitt et Hocking (2009).

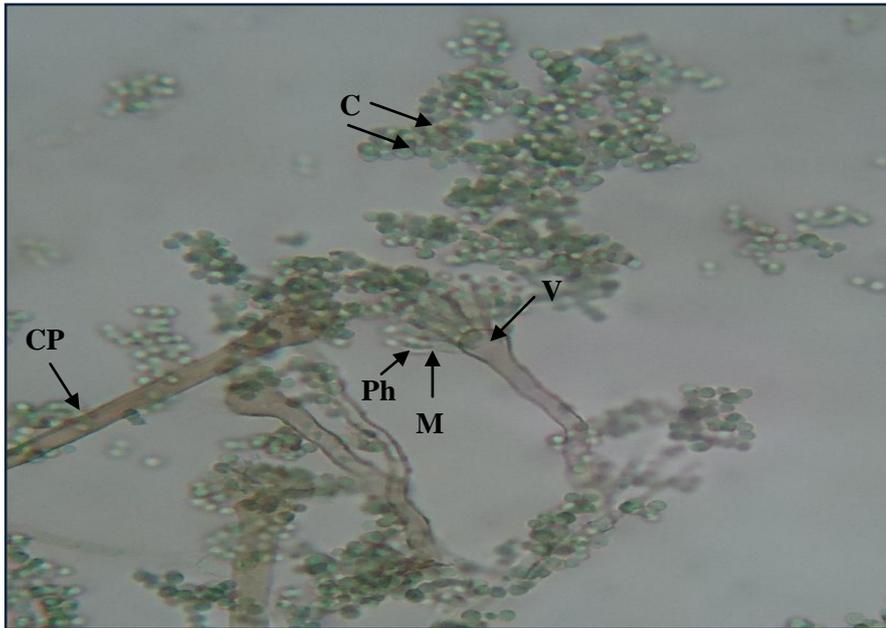


Figure 10 : Aspect microscopique d'*Aspergillus nidulans* sous microscope optique (g x40):

C: conidies, CP: conidiophore, V: vésicule. M: métule, Ph: phialide.

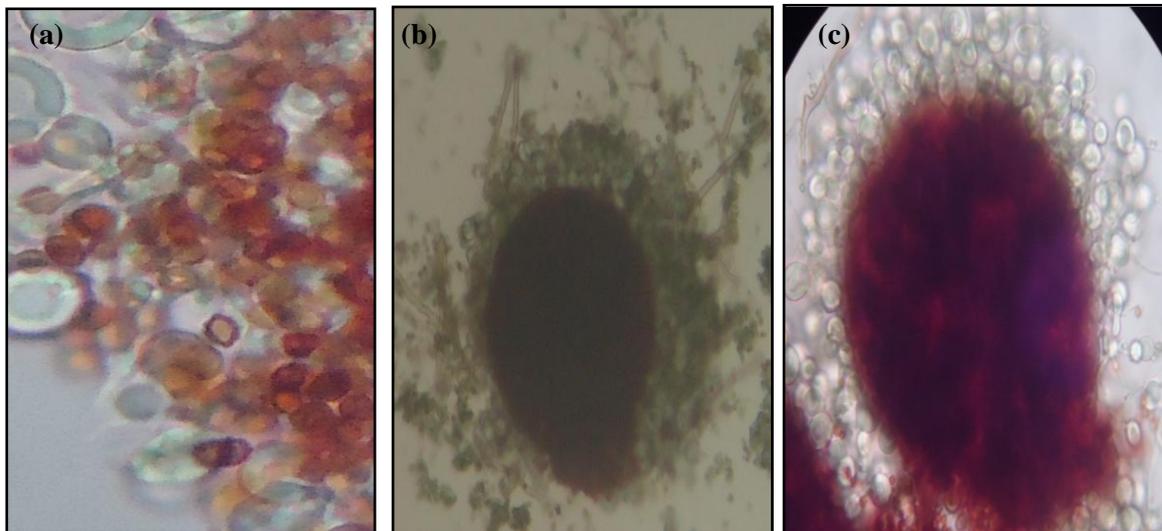


Figure 11: Organes de reproduction sexuée chez *Emericella nidulans* (téléomorphe d'*A. nidulans*):  
(a) Ascospores (gx25) (b, c) Cléistothèce associé à des cellules de Hülle (gx10 et x25 consécutivement).

### **4.3- Recherche de la STC dans les échantillons de maïs**

#### **4.3.1- Extraction de la STC à partir des grains de maïs**

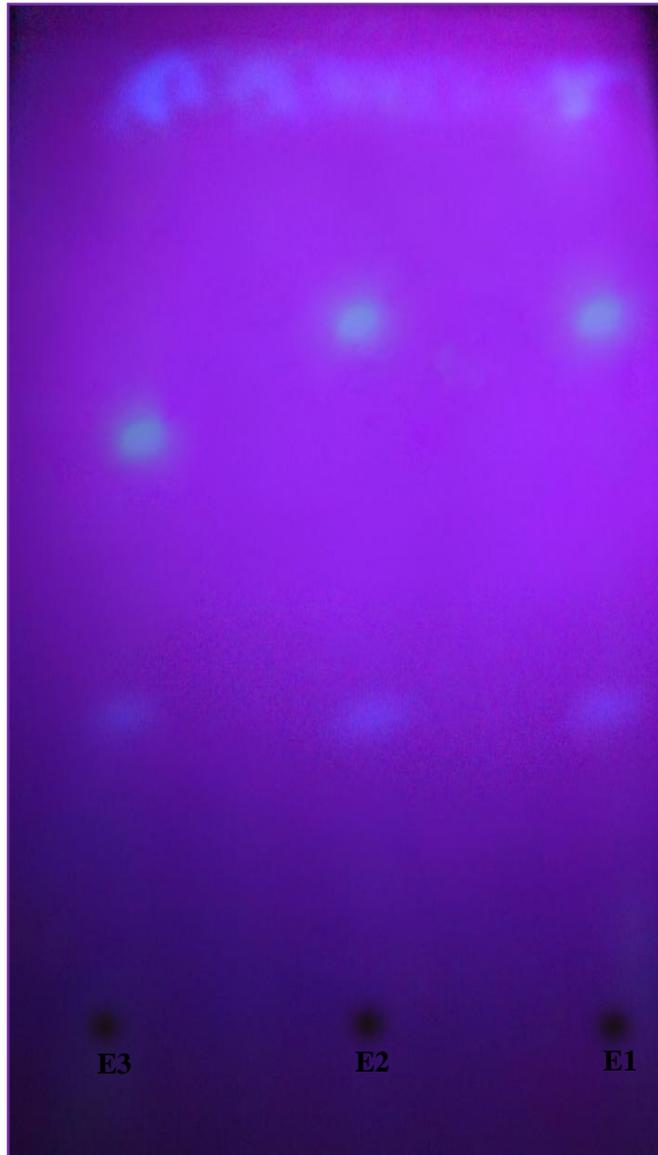
L'extraction liquide-liquide de la STC, à partir des grains de maïs, suivi par la déshydratation et la concentration a permis d'obtenir un extrait de couleur jaunâtre (figure 12).



**Figure 12:** Extrait à partir des grains de maïs.

#### **4. 3.2- Détection de la STC par CCM**

La détection de la STC par CCM dans les échantillons de maïs n'a pas abouti au résultat escompté (figure 13). Ceci dû, soit à l'absence de la toxine dans les échantillons exploités, soit les limites de détection par le procédé appliqué n'est pas suffisantes (la sensibilité de la méthode n'est pas importante), autrement dit, la quantité de stérigmatocystine dans les échantillons du maïs est très faible au moment de l'analyse.



**Figure 13:** Chromatogramme (CCM) des échantillons de maïs sous lumière UV 365 nm: **E** Échantillon. Absence de STC selon le procédé.

#### **4.4- Production de la STC**

Pour tester la capacité stérigmatogène de la souche isolée, une fermentation a été lancée sur le milieu YES, adapté pour induire la biosynthèse de la stérigmatocystine (Halls et Ayres, 1973; Peña-Montes et *al.*, 2009; Rank et *al.*, 2011 ; Handrich et *al.*, 2006).

##### **4.4.1- Cinétique de la croissance d'*Aspergillus nidulans***

L'allure de l'évolution de la biomasse (poids sec) en fonction du temps a une forme d'une courbe de croissance conventionnelle, caractérisée par ses quatre phases (figure14). Après une

phase de latence de 24 h, correspondant à la phase d'adaptation du microorganisme au milieu de culture et à la germination de l'inoculum (la germination des conidies débutent généralement après une dizaine d'heures de fermentation). Le mycélium entre dans une phase d'accélération, puis une phase exponentielle qui dure 120h (du 2<sup>e</sup> jusqu'au 7<sup>e</sup> jour) et caractérisée par une croissance rapide où le poids sec du mycélium atteint sa valeur maximale de 16,45 g/l. Le poids sec reste presque constant (16,45 à 16,13g/l) entre le 7<sup>e</sup> et 12<sup>e</sup> jour d'incubation, ce qui constitue la phase stationnaire. Cette dernière, peut être expliquée par le fait que la formation d'une partie du mycélium est accompagnée de la lyse d'une autre, celle-ci est utilisée comme nutriments pour le développement du reste du mycélium (Bushell, 1988). La croissance se termine par la phase de déclin à partir du 12<sup>e</sup> jour où la biomasse diminue jusqu'à 12,65 g/l (au 15<sup>e</sup> jour) à cause de l'épuisement du milieu et l'accumulation de déchets.

L'*Aspergillus nidulans* croît rapidement sur le milieu de fermentation. Cette croissance rapide est due à la présence de source de carbone et d'énergie (saccharose) adéquate dans le milieu de fermentation. Hitokoto et al. (1982) ont rapporté que les glucides comme le glucose et le saccharose favorisent la biosynthèse de STC par *A. nidulans* alors que d'autres sucres comme le galactose, le xylose, le mannitol et le lactose inhibent fortement cette synthèse. En effet, il est établi que la fermentation, produisant des métabolites secondaires, est considérée productive s'il y ait une accumulation importante de biomasse durant une trophopase courte, ce qui assure une idiopase plus lente (Marwick et al., 1999).

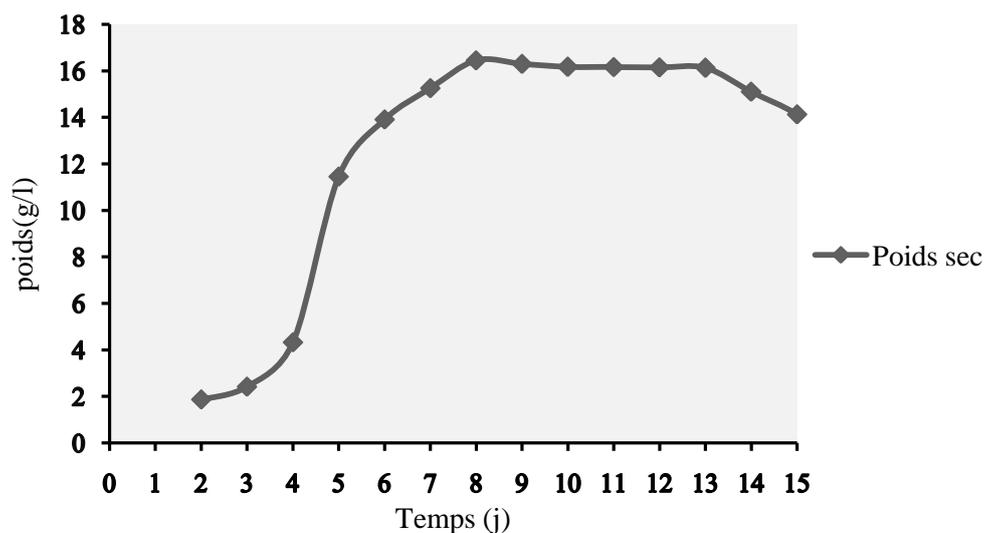


Figure 14: Cinétique de croissance d'*Aspergillus nidulans*.

#### **4.4.2- Extraction de la STC à partir du milieu de fermentation**

À la fin de la période de fermentation (15 jours), l'extraction de la STC a été faite par un système de solvant composé d'acétone et d'eau, puis la purification de celle-ci a été réalisée par le chloroforme où la STC est récupérée à partir de la phase aqueuse. Après déshydratation et concentration, un extrait de couleur brun foncé a été obtenu (figure15).

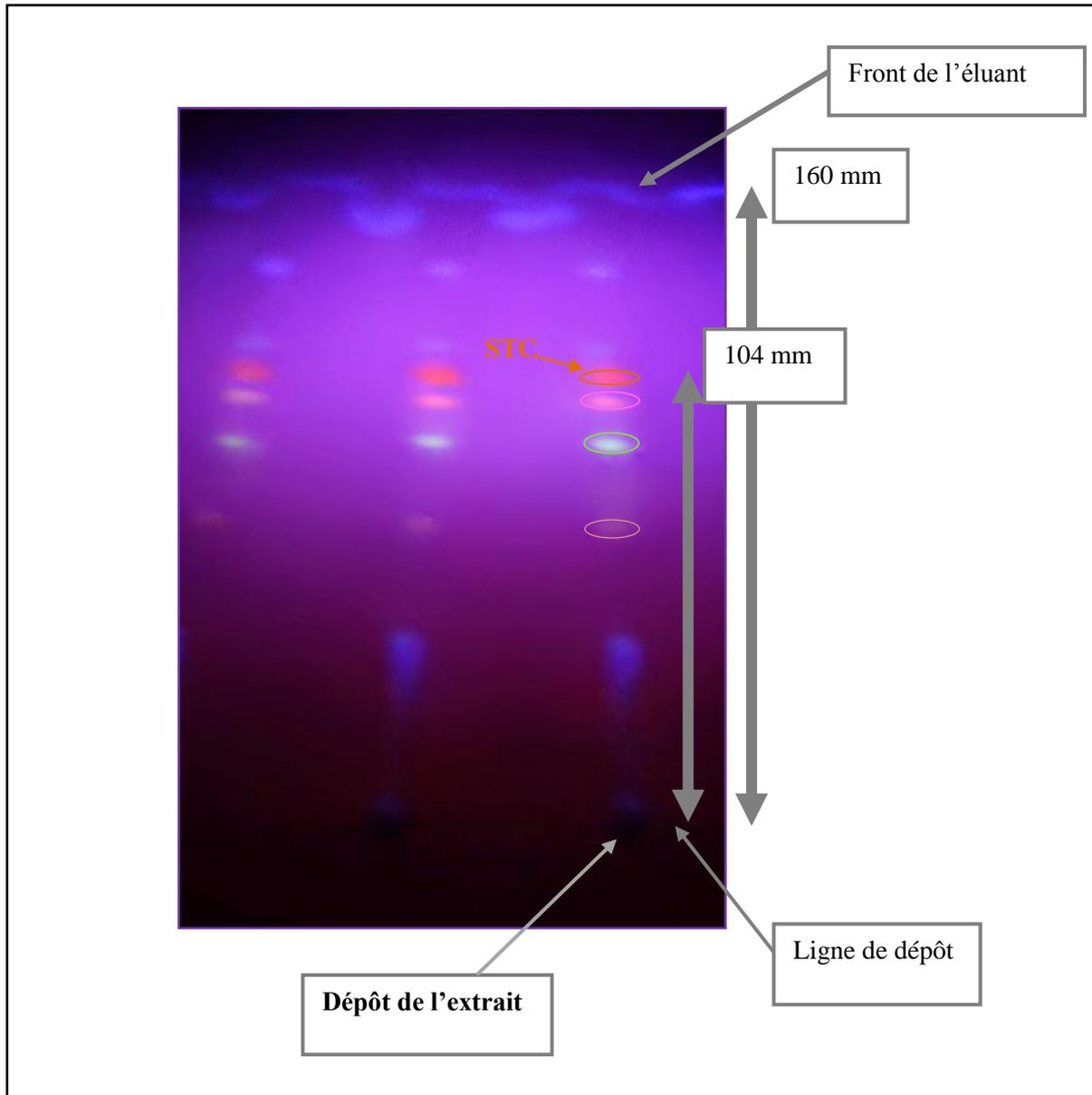


**Figure 15:** Extrait chloroformique de la fermentation.

#### **4.4.3- Détection de la STC par CCM**

La chromatographie sur couche mince de l'extrait a permis de séparer plusieurs spots, apparus sous formes de taches colorées après révélation sous lumière UV à une longueur d'onde de 365 nm. Les spots correspondant à la STC donnent une fluorescence rouge brique et un  $R_f=0,65$  (figure 16). Ces conclusions ont été obtenues suivant les recommandations de la littérature (Yu et Leonard, 1995; Seo et *al.*, 2003). La confirmation de la présence de STC est réalisée par une dérivation de celle-ci par une solution de chlorure d'ammonium à 20 % dans l'éthanol, suivie par chauffage à 80 °C pendant 10 mn. Cette étape est nécessaire pour augmenter leur fluorescence naturelle sous l'UV, et en faciliter la détection. Par ce procédé les taches de couleur rouge brique sont virées vers le jaune fluorescent sous une lumière UV. Cette constatation corrobore celle trouvée par plusieurs travaux (Vesonder et Horn, 1985; Hodges et *al.*, 1994).

Au terme de cette partie, la STC est bel et bien produite par la souche sélectionnée suivant la méthode développée. Cette production est reproductible chaque fois le besoin se manifeste.



**Figure 16:** Chromatographie sur couche mince présentant les spots de la STC produite par *A. nidulans* après 15 jours de fermentation. Séparée sur gel de silice par l'éluant Toluène /éthyle acétate/acide acétique 80/10/10 v/v/v.

#### 4.5- Étude de la toxicité subaigüe de la STC *in vivo*

Cette étude a été consacrée à l'évaluation de l'effet toxique, *in vivo*, de la STC en utilisant des rats femelles de type *Wistar albinos*. Une dose de 20 mg de STC/kg de poids corporel a été choisie à cette fin. Plusieurs paramètres sont pris en considération dans cette partie en l'occurrence: la variation du poids corporel de l'animal, du poids de foie et l'activité

enzymatique des enzymes hépatiques. Ensuite, ces résultats ont été confirmés par une étude histologique.

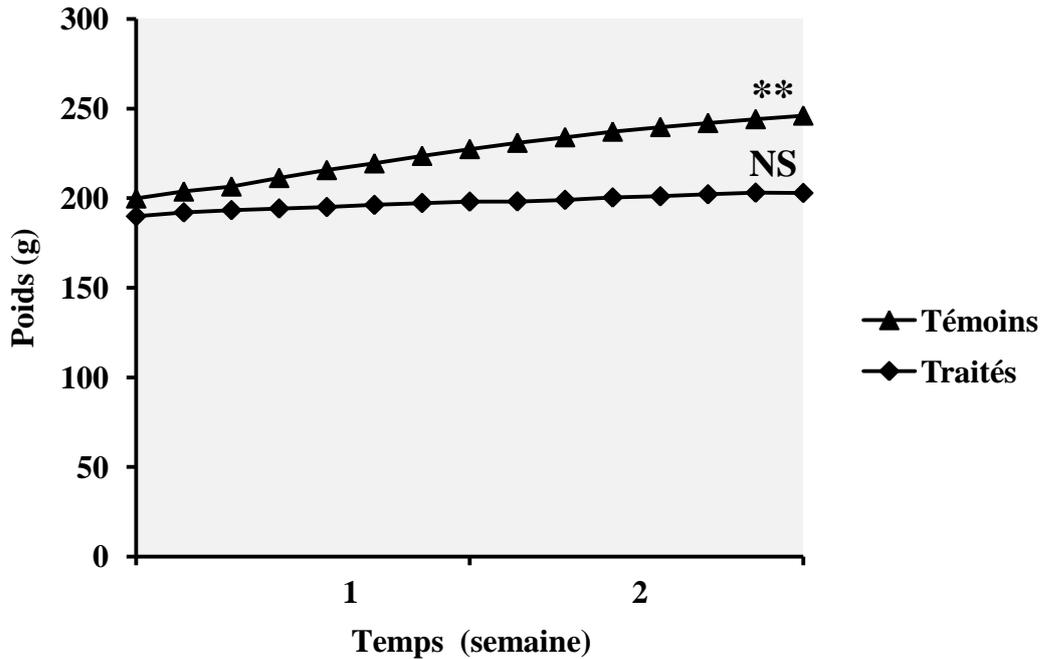
#### **4.5.1- Signes de toxicité**

Dans les conditions de la toxicité subaigüe (20 mg/kg), et après deux semaines de l'application, aucune mortalité n'a été observée chez les rats traités, accompagnée par l'absence de signes physiques de toxicité. En revanche, et à partir de la deuxième semaine, des diarrhées aigües et répétées ont été constatées chez les rats traités et absentes chez les rats témoins. Ce signe dû, vraisemblablement, à l'intoxication par la STC. Ce résultat se corrépond avec ce qui a été signalé par Vesonder et Horn (1985) chez les vaches laitières consommant de maïs infecté par la STC.

#### **4.5.2- Évolution du poids corporel des rats**

L'évolution de poids corporel des rats au cours de la période de traitement est présentée par la figure 17, qui montre que les rats traités et témoins exhibent une cinétique différente. Quoique, les deux lots enregistrent une augmentation du poids, néanmoins, chez le lot traité, cette augmentation n'est pas significative (6,84% par rapport au poids initial), alors que le gain du poids chez les rats témoins est sensiblement plus important (23,21%), ce qui laisse comprendre, que les rats témoins ont présenté une évolution normale en comparaison avec ceux traités. Plusieurs travaux ont rapportés des résultats similaires, en particulier ceux obtenus par Richard et *al.* (1977) qui ont montré que l'injection quotidienne d'une dose de 4,2 mg de STC /kg, pendant deux semaines provoque une perte significative du poids corporel ( $P < 0,01$ ). Par ailleurs, Shin et Kwon (2003) ont montré une régression du poids corporel induit chez des rats recevant 3mg/kg de la STC.

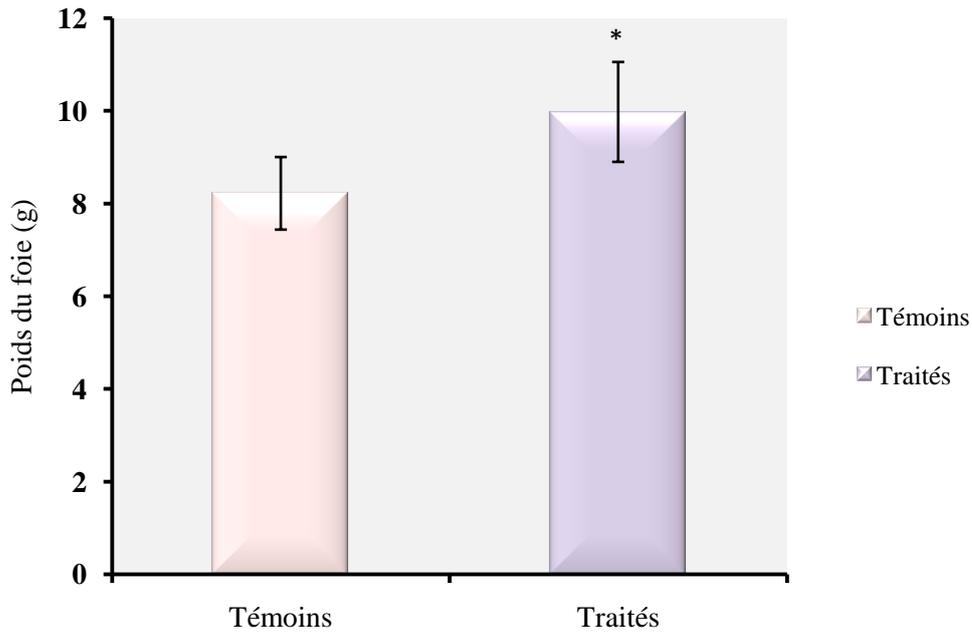
L'effet de la STC sur le gain du poids est effectif et il ne peut pas être expliqué par un refus d'alimentation par les animaux car, dans ce travail les rats ont reçu quotidiennement la STC par VI d'une part, et que les sujets traités et témoins consommaient une ration alimentaire quotidienne semblable. En revanche, cette perte de gain du poids peut être expliquée par l'inhibition de l'absorption de certains nutriments essentiels à la régulation de la croissance cellulaire comme il a été montré par Kunitomo et *al.* (1974).



**Figure 17:** Évolution du poids des rats témoins et traités durant les deux semaines de traitement: Chaque point représente la moyenne (n=6), (NS)  $P > 0,05$  différence non significatif; (\*\*)  $P < 0,01$ : différence hautement significatif par rapport au poids initial.

#### 4.5.3- Poids du foie

La variation du poids de foie chez les rats traités montre une augmentation de 21,41% par rapport au poids du foie des rats témoins. Cette augmentation, du point de vue statistique, est significative ( $P < 0,05$ ) (figure 18), due probablement à une intoxication par la STC consommée durant le traitement. Cet excès du poids peut être expliqué par l'accumulation de corps gras au niveau des cellules hépatiques, lié à une altération du métabolisme des lipides (Si-Trung, 2005). Ces résultats révèlent que l'organe cible de l'effet de la STC est le foie comme il a été montré, par ailleurs, par plusieurs travaux (Walkow et *al.*1985; Sreemannarayana et *al.*1987; Mahrous et *al.*2006).

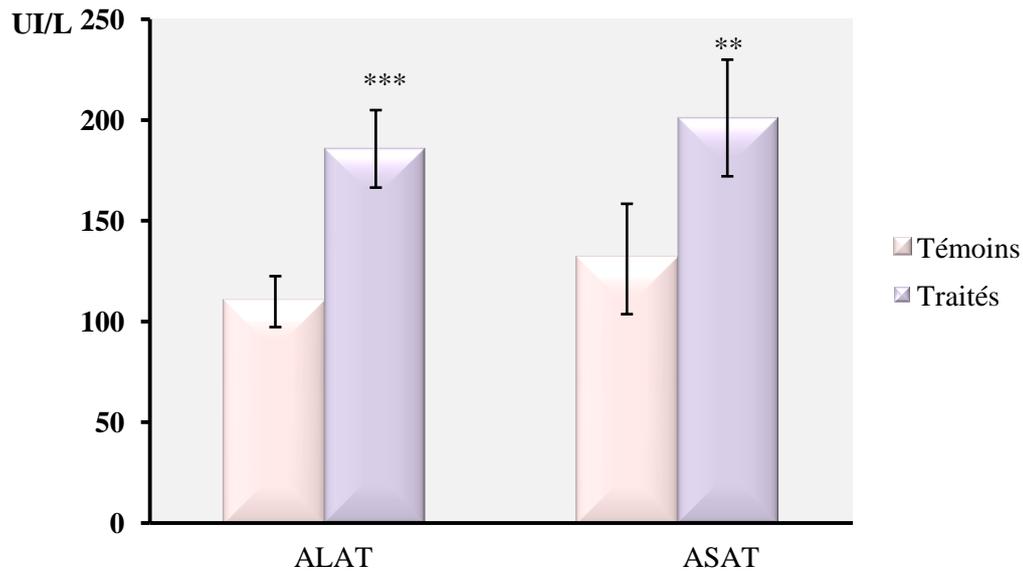


**Figure 18:** Effets de la STC sur le poids des foies des rats témoins et traités: Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n=6). (\*) $P < 0,05$ : différence significative par rapport aux témoins.

#### 4.5.4- Dosage des transaminases

Les effets de la STC, administrée quotidiennement, par VI et pendant deux semaines sur les activités de l'ALAT et de l'ASAT sont présentés dans la figure 19. Les résultats montrent une augmentation significative de l'activité enzymatique de l'ALAT ( $P < 0,001$ ) et de l'ASAT ( $P < 0,01$ ) pour tous les sujets traités en comparaison avec les témoins. En effet, le pourcentage de l'augmentation est de l'ordre de 69,04 pour l'ALAT et de 50,51% pour l'ASAT en comparaison, toujours, avec les animaux témoins.

Les transaminases sont les marqueurs biologiques les plus spécifiques d'une atteinte hépatique et de la nécrose hépatocyttaire. La spécificité est plus marquée pour l'ALAT, conséquence de leur distribution essentiellement hépatique dans l'organisme. Cette augmentation des transaminases pourrait être, donc, expliquée par une cytolyse hépatique comme il a été préconisé par Reynier (2011). Des résultats similaires ont été rapportés par Prisăkaru et Burlacu (2007) qui ont noté aussi l'augmentation des transaminases chez des rats traités par une dose de STC de 8mg /kg pendant 6 semaines.



**Figure 19:** Évaluation de l'activité enzymatique des transaminases des rats témoins et traités après deux semaines de traitement. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  *SD* (n=6). (\*\*\*)  $P < 0,001$ : différence très hautement significative par rapport aux témoins, (\*\*)  $P < 0,01$ : différence hautement significative par rapport aux témoins.

## 4.6- Étude histologique

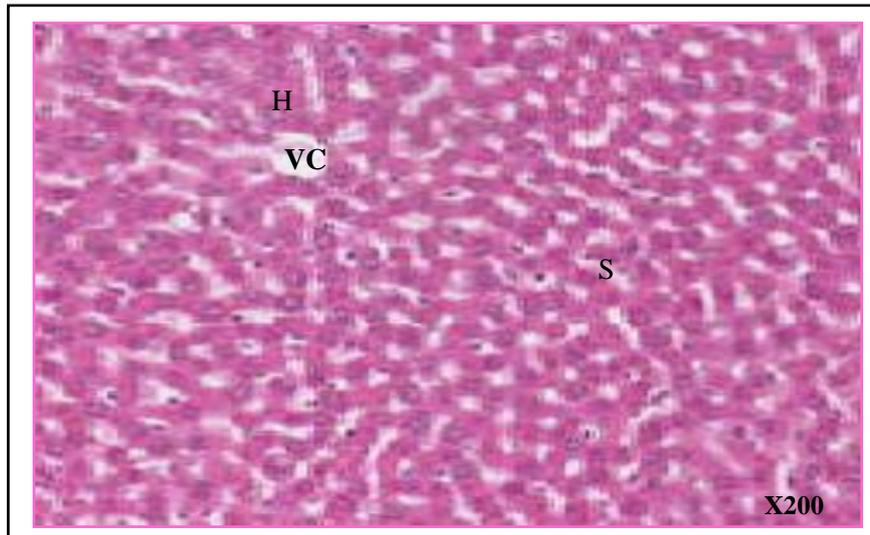
### 4.6.1- Examen macroscopique

A l'autopsie, aucune lésion n'a été constatée dans les foies des rats traités en comparaison avec ceux des rats témoins. Les foies présentent un aspect normal, de couleur marron clair et de consistance molle.

### 4.6.2- Examen microscopique

#### 4.6.2.1- Foies des rats témoins

L'histologie du foie des rats témoins montre que le parenchyme hépatique a une architecture lobulaire conservée, travées hépatocytaires régulières comportant une seule couche d'hépatocytes. Les hépatocytes sont disposés en travées autour des veines centro-lobulaires et contiennent un noyau central rond, bien net et un cytoplasme granuleux et préservé (figure20).



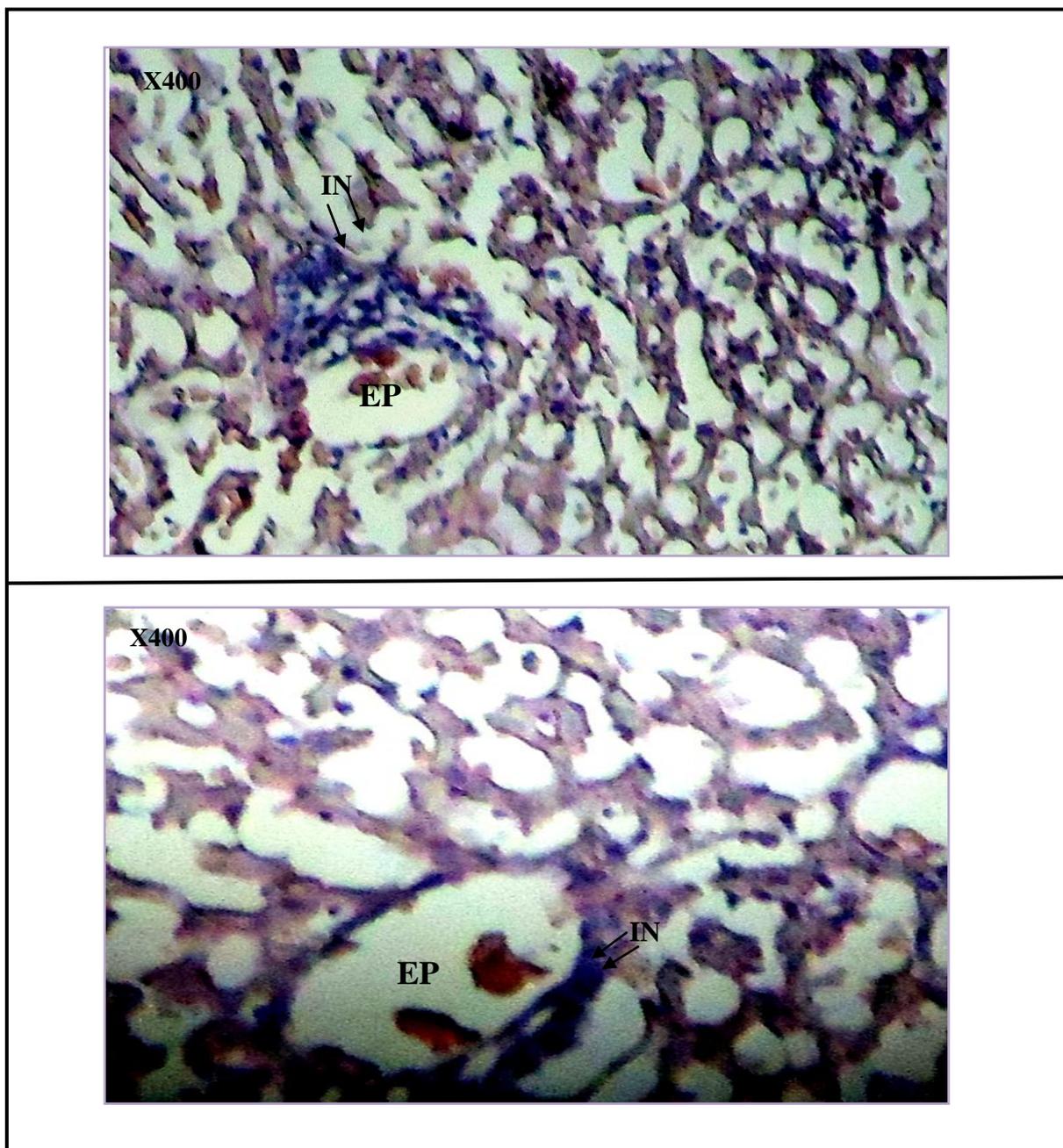
**Figure 20:** Histologie du foie des rats témoins : **H** Hépatocytes; **S** Sinusoïdes; **VC** Veine Centro-lobulaire.

#### 4.6.2.2- Foies des rats traités

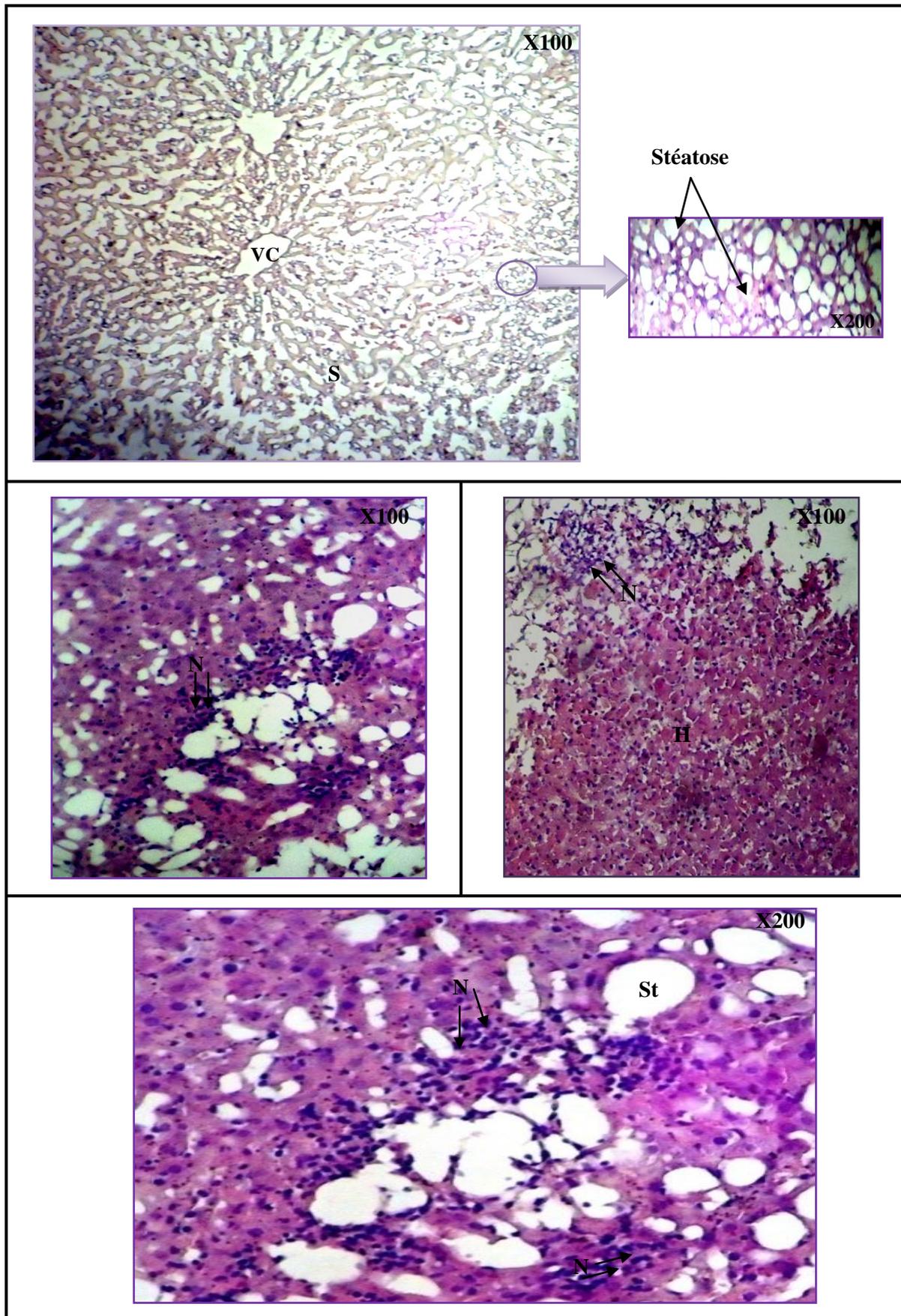
Chez le lot des rats traités par la STC, le parenchyme hépatique est d'architecture lobulaire plus ou moins conservée. Un infiltrat inflammatoire polymorphe intra portal, autour des espaces portes, a été constaté avec disparition des hépatocytes qui entourent ces zones (figure 21). La présence d'un infiltrat inflammatoire lobulaire polymorphe est fréquemment observée dans les zones périportales, témoignant d'une nécrose hépatocytaire. A proximité de ces zones nécrosées, le parenchyme hépatique présente des zones de stéatose macro- vésiculaire, refoulant le noyau en périphérie et rend les limites de cellules difficilement observables, et microvésiculaire (figure 22). Ces observations sont en accord avec ceux de Purshased et Van Der Watt (1969) et Sreemannarayana et *al.* (1987) qui ont observé une nécrose autour des voies péri portales de foies des rats injectés par VI avec la STG. Mahrous et *al.* (2006) ont aussi constaté la présence de nécrose et la lyse des cellules hépatiques chez des poissons administrés, par voie intra gastrique, de la STC. Purshased et Van der Watt (1969) et Abramson et *al.*, (1983) ont rapporté que la STC cause des stéatoses. Au contraire, nos résultats n'ont pas révélé la présence de capillarisation ou d'hémorragie à la veine centrale comme il est rapporté par Sreemannarayana et *al.* (1987).

La présence de nécrose correspond à la libération des contenus cytoplasmiques des hépatocytes, ce qui confirme les résultats de l'analyse biochimique qui ont révélé l'augmentation des taux de transaminases dans le sérum des rats traités. En outre, la présence des lésions de stéatose explique l'augmentation du poids de foie, constaté chez les rats traités.

Selon Prisăcaru et Burlaco (2007), la STC se comporte comme une hépatotoxine, sous la forme d'un radical libre l'époxy-stérigmatocystine qui est le principal métabolite du foie des animaux qui avaient consommé la mycotoxine parentale. Kawai et *al.*(1986) ont rapporté que la STC affecte la respiration mitochondriale par le blocage de la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie. Par ailleurs, Sivakumar et *al.* (2001) suggèrent que les lésions histologiques du foie causées par la STC ont été attribuées à la réduction des niveaux d'antioxydants comme le glutathion, l'acide ascorbique, et l'alpha-tocophérol.



**Figure21:** Histologie du foie des rats traités (coloration par Hématoxyline & Éosine):  
IN Infiltrat inflammatoire; EP Espace Porte.



**Figure 22 :** Histologie du foie des rats traités (coloration par Hématoxyline & Éosine):  
H Hépatocytes; N Nécrose; S Sinusoïde; St Stéatose; VC Veine Centro-lobulaire.

# Conclusion et Perspectives

## **5- Conclusion et Perspectives**

Les moisissures sont des microorganismes ubiquistes susceptibles de contaminer de nombreux produits destinés à l'alimentation des animaux et/ou des humains. Les céréales sont les matières premières les plus exposées à la contamination fongique. La conséquence possible d'un développement fongique incontrôlé est la production et l'accumulation des mycotoxines dans les aliments.

Bien que de nombreuses études aient déjà été publiées sur la STC, ses effets toxiques restent encore mal connus. La lecture de la littérature existante nous donne l'impression que l'on connaît encore très mal les effets réels de cette mycotoxine. D'ailleurs, aucune étude extensive n'a été faite sur l'effet de cette mycotoxine en Algérie. C'est donc, sous cet angle que la STC a retenu notre attention.

Pour cela nous nous sommes fixés comme objectifs l'exploitation du maïs commercialisé au niveau de la Wilaya de Constantine pour la recherche des moisissures susceptibles de produire de la STC et l'étude de la toxicité subaigüe de cette mycotoxine après sa production par la souche sélectionnée.

133 souches fongiques ont été isolées à partir des échantillons de maïs, ces isolats appartiennent à six genres : *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Rhizopus* et *Mucor*. De ce fait, il a été montré que le maïs pouvait être contaminé par des moisissures potentiellement toxigènes. *Aspergillus nidulans* a été largement étudié pour sa potentialité à produire la STC. C'est pourquoi, la souche isolée dans notre travail et identifiée comme *Aspergillus nidulans*, a été sélectionnée pour la suite du travail. La confirmation de son identification a été réalisée sur la base des tests macroscopiques et microscopiques (tests d'apparence). Dans ce travail la contamination de maïs avec la STC s'est révélée négative.

Le traitement de milieu de fermentation par des solvants appropriés et l'analyse de l'extrait par CCM a montré que la souche sélectionnée en l'occurrence l'*Aspergillus nidulans* produit des quantités remarquables de la STC. À cet égard, il est concluant que la présence de cette souche sur le maïs destinée à la consommation présente un danger potentiel.

L'étude de la toxicité subaigüe, *in vivo*, par la STC chez des rats femelles du genre *Wistar* a montré les effets suivants:

- ♦ La STC perturbe quelques les paramètres biochimiques sériques liés à la fonction hépatique (augmentation des concentrations sériques en l'ALAT et l'ASAT);
- ♦ L'observation histologique s'est caractérisée par quelques modifications structurales.

L'ensemble des données biochimiques et histologiques confirme l'effet toxique de la STC.

De nombreuses perspectives découlent de nos recherches:

- ♦ Il serait important de disposer de données sur la toxicité chronique, à long terme de la STC afin de pouvoir évaluer le risque d'une éventuelle contamination des aliments de façon précise.
- ♦ Il est important d'utiliser des techniques plus performantes pour l'identification de la STC à savoir la spectrométrie de masse et RMN.
- ♦ Il est nécessaire de faire des études plus poussées sur la contamination du maïs par d'autres mycotoxines. De plus, il serait intéressant d'élargir la gamme des aliments analysés (produits à base de maïs, produits destinés aux enfants et aux bébés, fromages, lait en poudre, café, boissons) et d'en déterminer la dose de prise journalière pour chaque mycotoxine.
- ♦ Une étude de la réponse immunitaire des sujets traités par la STC afin de déterminer, éventuellement, le potentiel de défense de l'animal vis-à-vis de ces substances.

Une enquête sur les maladies de cancer du foie en Algérie est préconisée, afin d'évaluer l'impact de ces contaminations et de mycotoxines sur la santé de la population.

# Références

## 6. Références bibliographiques

Aarab N. Les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves : de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain. Thèse de doctorat d'université : Ecotoxicologie des milieux aquatiques. Bordeaux: Université de Bordeaux 1. France. 2004. 276p.

Abdel-Wahhab M. A., Hasan A. M., Aly S. E., Mahrous K. F. (2005). Adsorption of sterigmatocystin by montmorillonite and inhibition of its genotoxicity in the Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Mutation Research*. **582**: 20–27.

Abramson D., Mills J.T., Boycott B.R. (1983). Mycotoxins and Mycoflora in Animal Feedstuffs in Western Canada. *Can J Comp Med*. **47**: 23-26.

AFSSA, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (2009). Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale Rapport final. Maisons-Alfort. 308p.

Atoui A. Approche de la mycotoxinogénèse chez *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus carbonarius*: études moléculaire et physiologique. Thèse de doctorat d'université : Microbiologie et biocatalyse industrielles. Toulouse : Institut National Polytechnique. France. 2006. 245p.

Baath H, Knabe O, Lepom P. (1990). Occurrence of *Fusarium* species and their mycotoxins in corn silage. *Fusarium* infestation in corn silage. *Arch Tierernahr*. **40(4)**: 397–405.

Barnes S.E., Dola T.P., Bennett J.W., Bhatnagar D. (1994). Synthesis of sterigmatocystin on a chemically defined medium by species of *Aspergillus* and *Chaetomium*. *Mycopathologia*. **125**: 173-178.

Bejaoui H. Champignons ochratoxinogènes et ochratoxine A (OTA) dans des vignobles Français et procédés biologiques de décontamination de l'OTA dans les moûts de raisin. Thèse de doctorat d'université : Génie des procédés et de l'environnement. Toulouse : Institut National Polytechnique. France. 2005. 228p.

- Belli N., Marin S., Sanchis V. and Ramos A. J. (2004). Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. *International Journal of Food Microbiology*. **96**: 19-27.
- Bennett J. W. (2009). *Aspergillus*: a primer for the novice. *Medical Mycology*. **47 (S1)**: S5-S12.
- Bennett T.W. (2010). On overview of the genus *Aspergillus*. In: *Aspergillus*. Molecular biology and genomics. Machida M. Gomi K., 1-19.
- Bennett J. W., Henderberg A., Grossman K. (1989). Sterigmatocystin production on complex and defined substrates. *Mycopathologia*. **105**:35-38.
- Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J-J., Vayssier Y and Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. (edn) Masson, Paris. 512p.
- Brochard G. Les mycotoxines en milieu de travail. Thèse de doctorat en médecine. Paris : l'université René Descartes Paris5. France. 2005. 238p.
- Brochard G. Le Bâcle C. (2009). Les mycotoxines en milieu de travail. Documents pour le Médecin du travail N°119. INRS.
- Brochard G., Le Bâcle C. (2010). Les mycotoxines en milieu de travail. Documents pour le Médecin du travail N°121. INRS.
- Brown D. W., Yu J.-H., Kelkardt H. S., Fernandest M., Nesbitt T. C., Keller N. P., Adamst T. H., Leonard T. J. (1996). Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**: 1418-1422.
- Bushell M.E. (1988). Growth product formation and fermentation technology dans. «*Actinomycetes in Biotechnology* » .Academic Press. London . pp : 185-217.
- Canadas D. Evaluation du procédé Oxygreen® pour son potentiel de décontamination en ochratoxine A du blé. Les effets toxiques liés à une exposition sub-chronique à l'ochratoxine A sont-ils atténués?. Thèse de doctorat d'université : Génie des procédés environnement. Toulouse : Institut National Polytechnique. France. 2006.232.

Chabasse D., Bouchara J.P., Gentile L., Brun S., Cimon B., Penn P (2002). Les moisissures d'intérêt médical. (edn) Bioforma. Paris. 160p.

Chasseur C., Nolard N. (2003). Les champignons de l'habitat. 1<sup>ère</sup> partie introduction à la mycologie, risques pour la santé, expertises dans Recherches et Études. *CSTS magazine*.

**Chen J., Liu D., Li S., Yao D., (2010).** Development of an amperometric enzyme electrode biosensor for sterigmatocystin detection. *Enzyme and Microbial Technology*. **47: 119-128.**

Chung D.H., Abouzied M. M., Pestka J. J. (1989). Immunochemical assay applied to mycotoxin biosynthesis: ELISA comparison of sterigmatocystin production by *Aspergillus versicolor* and *Aspergillus nidulans*. *Mycopathologia*.**107: 93-100.**

Delgado-Virgen F., Guzman-de-Peña D.(2009). Mechanism of sterigmatocystin Biosynthesis Regulation by pH in *Aspergillus nidulans*. *Braz.J.Microbiol.* **40** (4): 1517-1590.

Dezotti N. O. C. R., Zucchi T. M. A. D. (2001). Identification of *Aspergillus nidulans* Genes Essential for the Accumulation of Sterigmatocystin. *Fungal Genetics and Biology* . **34: 93–105.**

Dutton M.F. (2009). The African Fusarium/maize disease. *Mycotox Res.* **25: 29–39.**

Ehrlich K. C., Montalbano B. G., Cotty P. J. (2005). Divergent regulation of aflatoxin production at acidic Ph by two *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*.**159: 579–581.**

El-Agamy D. S. (2010). Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B1-induced liver injury in rats. *Arch Toxicol.* **84:389–396.**

El-Shanawany A.A., Eman Mostafa M., Barakat A.(2005). Fungal populations and mycotoxins in silage in Assiut and Sohag governorates in Egypt, with a special reference to characteristic *Aspergilli* toxins. *Mycopathologia*. **159: 281–289.**

Ellis S. D., Boehm M. J., Mitchell T. K. (2008). Fungal and Fungal-like Diseases of Plants. The Ohio State University. *Fact Sheet*.

- Engelhart S., Loock A., Skutlarek D., Sagunski H., Lommel A., Färber H., Exner M. (2002). Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. *Appl Environ Microbiol.* **68(8)**: 3886-3890.
- Erikson O.E. and Hawksworth P.L. (1998). Outline of the Ascomycetes . *System. Ascomycelium.* **16**: 283- 296.
- Essigmann J. M., Barker L. J., Fowlert K. W., Franciscot M. A., Reinholdt V. N., Wogan G. N.(1979). Sterigmatocystin-DNA interactions: Identification of a major adduct formed after metabolic activation in vitro. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* **76(1)**: 179-183.
- Franzolin M.R., Gambale W., Cuero R.G., Correa B. (1999). Interaction between toxigenic *Aspergillus flavus* Link and mites (*Tyrophagus putrescentiae* Schrank) on maize grains: effects on fungal growth and aflatoxin production. *Journal of Stored Products Research.* **35**: 215-224.
- Frisvad, J. C., Filtenborg, O. (1983). Classification of terverticillate *Penicillia* based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites, *Appl. Environ. Microbiol.* **46**:1301-1310.
- Gacem M. A., Ould El Hadj K. A. et Gacemi B. (2011). Étude de la qualité physico-chimique et mycologique du blé tendre local et importé stocké au niveau de l’office algérien inter-professionnel des céréales (OAIC) de la localité de Saida (Algérie). *Algerian journal of arid environment.* **1(2)**:67-76.
- Geiser D.M., Klich M.A., Frisvad J.C., Peterson S.W., Varga J., Samson R.A. (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology.* **59**: 1–10.
- Gengan R. M., Chuturgoon A. A., Mulholland D. A., Dutton M. F. (1999). Synthesis of sterigmatocystin derivatives and their biotransformation to aflatoxins by a blocked mutant of *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia* **144**: 115–122.
- Ghiasian S.A., Bacheh P. K.-, Rezayat S. M., Maghsood A. H., Taherkhani H. (2004). Mycoflora of Iranian maize harvested in the main production areas in 2000. *Mycopathologia* **158**: 113–121.

- Gonzalez H.H.L. , Resnik S.L., Boca R.T., Marasas W.F.O. (1995). Mycoflora of Argentinian corn harvested in the main production area in 1990. *Mycopathologia*. **130**: 29-36.
- Gugnani H. C. (2003). Ecology and taxonomy of pathogenic Aspergilli. *Frontiers in Bioscience*. **8**: 346-357.
- Guiraud J.P. (2003). Microbiologie alimentaires. (edn) Dunod. Paris. 651p.
- Guzmán-de-Peña D., Aguirre J., Ruiz-Herrera J.(1998). Correlation between the regulation of sterigmatocystin biosynthesis and asexual and sexual sporulation in *Emericella nidulans*. *Antonie van Leeuwenhoek*. **73**: 199–205.
- Halls N. A., Ayres J. C.(1973). Potential production of sterigmatocystin on country-cured Ham.*Applied Microbiology*. **26(4)**: 636-637.
- Handrich C., Müller M., Westphal G., Hallier E., Bünger J. (2006). Detection of unknown toxic mycotoxins in *Aspergillus nidulans* using a structure-activity approach. *Mycotoxin Research*. **22**: (4), 201-205.
- Hicks J.K., Yu J. H., Keller N. P., Adams T. H. (1997). *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G<sub>α</sub> protein-dependent signaling pathway. *The EMBO Journal* (**16**): 4916–4923.
- Hitokoto H., Morozumi S., Wauke T., Akai S. , Yoshikawa S. (1982). Chemically defined medium for high yields of sterigmatocystin. *Mycopathologia* ; **78** : 99-105.
- Hodges R.L., Hodges D.W., Goggans K., Xuei X., Skatrud P., McGilvray D. (1994). Genetic modification of an echinocandin B-producing strain of *Aspergillus nidulans* to produce mutants blocked in sterigmatocystin biosynthesis. *Journal of Industrial Microbiology*. **13**: 372-381.
- Isebaert S., Haesaert G., Devreese R., Maene P., Fremaut F., Vlaemyneck G. (2005). *Fusarium spp* and *Fusarium* mycotoxins in maize: a problem for Flanders?. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* **70**: 129-136.
- Isik K., Chun J., Hah Y.C. and Goodfellow M. (1999). *Nocardia Salmocida*: a fish pathogen. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 833-837.

- Jorgensen K., Rasmussen G., Thorup I. (1996). Ochratoxin A in Danish cereals 1986-1992 and daily intake by the Danish population. *Food Additives and contaminants*. **13**: 15-16.
- Kaaya A.N., Kyamuhangire W. (2006). The effect of storage time and agroecological zone on mould incidence and aflatoxin contamination of maize from traders in Uganda, *Intern. J. of Food Microbiol.* **110**: 217-223.
- Kato N., Brooks W., Calvo A. M. (2003). The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *vea*, a gene required for sexual development. *Eukaryotic Cell*. **2 (6)**: 1178–1186.
- Kawai K., Nakamaru T., Hisada K., Nozawa Y. (1986). The Effects of Demethylsterigmatocystin and Sterigmatin on ATP Synthesis System in Mitochondria: A Comparison With Sterigmatocystin and Hideki Mori. *Mycotoxin Research*. **(2)**: 33-38.
- Kelkar H. S., Keller N., Adams T. H. (1996). *Aspergillus nidulans stcP* Encodes an O-Methyltransferase that is required for sterigmatocystin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. **62(11)**:4296–4298.
- Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A. (2008). *Dictionary of the Fungi*. 10<sup>th</sup> (edn), CABI.
- Klich M., Mendoza C., Mullaney E., Keller N., Bennett J. W. (2001). A New sterigmatocystin-producing *Emericella* Variant from Agricultural Desert Soils. *System. Appl. Microbiol.* **24**: 131–138.
- Krska R. (2009). Mycotoxins. *Anal Bioanal Chem.* **395**: 1203–1204.
- Kunimoto T., Kurimoto Y., Aibara K., Miyaki K. (1974). Inhibition of Nucleoside Transport by Aflatoxins and Sterigmatocystin. *Cancer Research*. **34**: 968-973.
- Kusunoki M., Misumi J., Shimada T., Aoki K., Matsuo N., Sumiyoshi H., Yamaguchi Y., Yoshioka H. (2011). Long-term administration of the fungus toxin, sterigmatocystin, induces intestinal metaplasia and increases the proliferative activity of PCNA, p53, and MDM2 in the gastric mucosa of aged Mongolian gerbils. *Environ Health Prev Med.* **16**: 224-231.

- Lavaud F., Leynadier F., Marmouz F., Vervloet D. (2008). Les moisissures sont-elles dangereuses pour la santé. Le journal faxé d'allergologie.
- Leclerc F. C., Papon N., Noel T., Villard J.(2005). Moisissures et risques alimentaires (Mycotoxicoses). *Revue Francophone des Laboratoires*. **373** : 61-66.
- Lecompte M (2008). Classification des champignons. [En ligne] [www.champignons-passion.be/ClassificationGen.pdf](http://www.champignons-passion.be/ClassificationGen.pdf).
- MacCabe A.P., Orejas M., Tamayo E.N., Villanueva A., Ramón D. (2002). Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Biotechnology*. **96**: 43–54.
- Magnoli C., Hallak C., Astoreca A., Ponsone L. (2006). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in commercial corn kernels in Argentina. *Mycopathologia*. **161**: 53–58.
- Mahrous K.F. Khalil W. K. B., Mahmoud M. A. (2006). Assessment of toxicity and clastogenicity of sterigmatocystin in Egyptian Nile tilapia. *African Journal of Biotechnology*. **5 (12)**: 1180-1189.
- Makun H.A. Gbodi T. A., Akanya O. H., Salako E. A., Ogbadu G. H. (2007). Fungi and some mycotoxins contaminating rice (*Oryza Sativa*) in Niger State, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. **6 (2)** : 099-108.
- Marwick J.D., Wight P.C. and Burgess J.G. (1999). Bioprocess identification for production of novel marine bacterial antibiotics .Through bioreactor operation and design. *Mar. Biotechnol.* **12**: 495-507.
- Metwally MM., El-Sayed AM abd Alia, Mehriz AM., Abu Sree. (1997). Sterigmatocystin - Incidence, fate and production by *A versicolor* in Ras cheese. *Mycotoxin Research*. **13**: 61-66.
- Mills J.T., Sinha R.N., Wallace H.A.H. (1978). Multivariate evaluation of isolation techniques for fungi associated with stored rapeseed. *Phytopathology*. **68**: 1520-1525.
- Moreno E. C., Garcia G. T., Ono M. A., Vizoni É., Kawamura O., Hirooka E. Y. et al. (2009). Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. *Food Chemistry* **116** :220–226.

- Nafees B. Caractérisation des polycétones synthases intervenant dans la biosynthèse d'ochratoxine a, d'acide pénicillique, d'asperlactone et d'isoasperlactone chez *Aspergillus westerdijkiae*. Thèse de doctorat d'université : Microbiologie et Biocatalyse Industrielles. Toulouse : Institut National Polytechnique. France. 2009.255p.
- Nguyen Minh Tri M. Identification Des Espèces De Moisissures, Potentiellement Productrices De Mycotoxines Dans Le Riz Commercialisé Dans Cinq Provinces De La Région Centrale Du Vietnam - Etude Des Conditions Pouvant Réduire La Production Des Mycotoxines. Thèse De Doctorat D'université : Génie Des Procédés Et De L'environnement. Toulouse : Institut National Polytechnique. France. 2007. 147p.
- Oryan A., Eftekhari M. H., Ershad M., Panjehshahin M.R., Tabatabaei H. R. (2011). Hepatoprotective effects of whey protein isolate against acute liver toxicity induced by dimethylnitrosamine in rat. *Comp Clin Pathol.* **20**: 251–257.
- Pacin A.M., González H.H.L., Etcheverry M., Resnik S.L., Vivas L., Espin S.(2002). Fungi associated with food and feed commodities from Ecuador. *Mycopathologia* **156**: 87–92.
- Pamel E. V., Vlaemyneck G., Heyndrickx M., Herman L., Verbeken A., Daeseleire E. (2010). Mycotoxin production by pure fungal isolates analysed by means of an uhplc-ms/ms multi-mycotoxin method with possible pitfalls and solutions for patulin-producing isolates. *Mycotox Res.* 1-11.
- Peña-Montes C., Lange S., Flores I., Castro-Ochoa D., Schmid R., Cruz-García F. et al., (2009). Molecular characterization of StcI esterase from *Aspergillus nidulans*. *Appl Microbiol Biotechnol.***84**:917–926.
- Piontek M. (2007). Strains Of *Aspergillus Versicolortiraboschi* Synthesizing Sterigmatocystin And The Differentiation Of Mycotoxic Risk Dependent On Their Productivity In Housing Buildings. *Mycotoxin Research.* **23** (1): 34-38.
- Pitt J.I., Hocking A. D. Fungi and food spoilage. (2009). 3<sup>rd</sup> ed. Springer. New York. 524p.
- Prisăcaru C., Burlacu A.-I. (2007). the diminution of sterigmatocystin toxicity by the antiradical action of some flavonoid- containing plant products. *Cercetări Agronomice în Moldova.* **3**: 73-79.

- Purchase I. F. H., Van Der Watt J. J. (1969). Acute Toxicity of Sterigmatocystin to Rats. *Fd Cosmet Toxicol.* **7**: 135-139.
- Rabie C. J., Steyn M., Van Schalkwyk G. C. (1977). New species of *Aspergillus* producing sterigmatocystin. *Applied and Environmental Microbiology.* **33(5)**: 1023-1025.
- Rank C., Nielsen K. F., Larsen T. O., Varga J., Samson R. A., Frisvad J. C. (2011). Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biology.* **153**: 1-15.
- Reboux G. (2006). Mycotoxines : effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique.* **46** : 208–212.
- Reboux G., Bellanger A.-P., Roussel S., Grenouillet F., Millon L.(2010). Moisissures et habitat : risques pour la santé et espèces impliquées. *Revue des Maladies Respiratoires.* **27**:169—179.
- Reverberi M., Ricelli A., Zjalic S., Fabbri A. A., Fanelli C. (2010). Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* **87**:899–911
- Reynier C. Faibles perturbations des transaminases en médecine générale : Analyse des pratiques et étude prospective descriptive des principales étiologies dans la région annécienne de mars à octobre 2010. Thèse De Doctorat en médecine. Grenoble: université Joseph Fourier. France. 2011. 175p.
- Riba A., Mokrane S., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. (2008). Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. *International Journal of Food Microbiology.* **122**:85–92.
- Richard J. L., Thurston J. R., Lillehoj E. B., Cysewski S. J., Booth, G. D.(1977). Complement Activity, Serum Protein, and Hepatic Changes in Guinea Pigs Given Sterigmatocystin or Aflatoxin, Alone or in Combination. *The Am J Vet Res.* **39(1)**: 163-166.
- Rojas T.R., Sampayo C.A.F., Vázquez B.I., Franco C.M., Cepeda A. (2005). Study of interferences by several metabolites from *Aspergillus* spp. in the detection of aflatoxigenic strains in media added with cyclodextrin. *Food Control.* **16**: 445–450.

Roquebert M.F.(1997). Les moisissures: nature, biologie et contamination. [En ligne] [www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/cours/roqueber.htm](http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/cours/roqueber.htm).

Ruppel P., Delfosse Ph, Hornick J. L. (2004). La contamination de la filière laitière par les mycotoxines : un risque pour la santé publique en Afrique subsaharienne. *Ann. Méd. Vét.* **148**: 141-146.

Seo J.-A., Guan Y., Yu J.-H. (2003). Suppressor Mutations Bypass the Requirement of *fluG* for Asexual Sporulation and Sterigmatocystin Production in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **165**: 1083–1093.

Schmidt R., Mondani J., Ziegenhagen E., Dose K. (1981). High-performance liquid chromatography of the mycotoxin sterigmatocystin and its application to the analysis of mouldy rice for sterigmatocystin. *Journal of Chromatography.* **207**: 435-438.

Shin H.-S, Kwon S.-K. (2003). Synthesis of Allylthiopyridazine Derivatives and Inhibition of Aflatoxin B1-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Arch Pharm Res.* **26** (5): 351-357.

Sinha V.K., Ranjan K.S., Pandey T.N. (2001). Mycotoxigenic infestation in samples of cereal straw from Bihar, India. *Mycotoxin Research.* **17**: 59-67.

Sĩ- Trung T. Caractérisation de biomarqueurs d'exposition à la fumonisine b1 chez les palmipèdes. Thèse de doctorat d'université : Mycotoxicologie. Toulouse : Institut National Polytechnique. France. 2005. 174p.

Sivakumar V, Thanislass J, Niranjai S, Devaraj H (2001). Lipid peroxidation as a possible secondary mechanism of sterigmatocystin toxicity. *Hum. Exp. Toxicol.* **20**: 398-403.

Skrinjar M, Stubblefield RO, Vujicic IF. Ochratoxigenic moulds and ochratoxin A in forages and grain feeds. *Acta Vet Hung* 1992; 40(3): 185–190.

Sreemannarayana o., Frohlich A. A., Marquardt R. R. (1987). Acute toxicity of sterigmatocystin to chicks. *Mycopathologia.* **97**: 51- 59.

Sreenivasa M.Y., Dass R.S., Charit Raj A.P. (2011). Mycological evaluation of maize grains produced in Karnataka (India) for the post harvest fungal contamination. *World Applied Sciences Journal.* **13** (4): 688-692.

Tabuc C. Flore Fongique De Différents Substrats Et Conditions Optimales De Production Des Mycotoxines. Thèse De Doctorat D'université : Pathologie, Mycologie, Génétique Et Nutrition. Toulouse : L'institut National Poly Technique Et De L'université De Bucarest. France. 2007. 190p.

Takahashi J.A., Monteiro de Castro M.C., Souza G.G., Lucas E.M.F., Bracarense A.A.P., Abreu L.M., et al. (2008). Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. *J. med. mycol.* **18**: 198-204.

Tahani N., Elamrani A., Serghini-Caid H., Ouzouline M., Khalida. (2008). Isolement et Identification de souches de moisissures réputées toxigènes. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* **2** (1): 81-91.

Tilburn J., Sarkar S., Widdick D. A., Espeso E.A., Orejas M., Mungroo J. et al. (1996). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline expressed genes by ambient pH. *The EMBO Journal.* **14** (4): 779-790.

Tortora J., Funk B.F. and Case Ch.I. (2003). Introduction à la microbiologie. (edn). ISBN. Canada. 945p

Tozlovanu M. Evaluation du risque de contamination alimentaire en mycotoxines néphrotoxiques et cancérogènes (notamment l'ochratoxine A) : Validation de biomarqueurs d'exposition et d'effet. Thèse de doctorat d'université : Toxicologie et Sécurité des Aliments. Toulouse : Institut National Polytechnique. France. 2008. 261p.

Tran-Dinh N. Kennedy I., Bui T., Carter D. (2009). Survey of Vietnamese peanuts, corn and soil for the presence of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia.* **168**: 257-268.

Tuomi T., Johnsson T, Hintikka E.L., Reijula K. (2001). Detection of aflatoxins (G1-2, B1-2), sterigmatocystin, citrinine and ochratoxin A in samples contaminated by microbes. *Analyst.* **126**: 1545-1550.

- Veršilovskis A., Bartkevičs V. (2012). Stability of sterigmatocystin during the bread making process and its occurrence in bread from the Latvian market. *Mycotoxin Res.* 1-7.
- Veršilovskis A., Bartkevičs V., Miķelsone V. (2007). Analytical method for the determination of sterigmatocystin in grains using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with electrospray positive ionization. *Journal of Chromatography A*, **1157**: 467–471.
- Veršilovskis A., De Saeger S., Miķelsone V. (2008). Determination of sterigmatocystin in beer by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *World Mycotoxin Journal*. **1(2)**: 161-166.
- Vesonder R. F., Horn B. W. (1985). Sterigmatocystin in Dairy Cattle Feed Contaminated with *Aspergillus versicolor*. *Applied And Environmental Microbiology*. **49 (1)**: 234-235.
- Vytřasová J., Přibáňová P., Marvanová L. (2002). Occurrence of xerophilic fungi in bakery gingerbread production. *International Journal of Food Microbiology*. **72** :91– 96.
- Ward O. P., Qin W. M., Dhanjoon J., Ye J., Singh A. (2006). Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology*. **58** : 1-75.
- Walkow J., Sullivan G., Maness D., Yakatan G.J. (1985). Sex and age differences in the distribution of <sup>14</sup>C-sterigmatocystin in immature and mature rats: A multiple dose study. *J Amer Coil Toxicol*. **4**:45 - 51.
- Wilkinson H.H., Ramaswamy A., Sim S. C., Keller N. P. (2004). Increased conidiation associated with progression along the sterigmatocystin biosynthetic pathway. *Mycologia*. **96(6)**: 1190–1198.
- Xu-Ming S., Xiang-Hong Z., Hui-Yan W., Wen-Jun C., Xia Y., Lian-Fu Z. et al.,(2002). Effects of Sterigmatocystin, Deoxynivalenol and Aflatoxin G1 on Apoptosis of Human Peripheral Blood Lymphocytes *in vitro*. *Biomedical and Environmental Sciences*. **15**:145-152.
- Yu J.H., Leonard T. J. (1995). Sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus nidulans* requires a novel type I polyketide synthase. *Journal Of Bacteriology*. **177 (16)**: 4792–4800.

Zinedine A., Mañes J.(2009). Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. *Food Control* **20**: 334–344.

[Tapez un texte]

# Annexes

## Annexe 1

Exemple des concentrations maximales autorisées des mycotoxines dans les produits alimentaires dans l'Union Européenne (selon le règlement de la Commission Européenne n° 1881/2006 du 19 décembre 2006 portant fixation des teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, modifiés par le règlement (CE) N° 1126/2007 du 28 septembre 2007).

Produits	Mycotoxines	Valeur µg/kg
Arachides, fruits à coque, fruits séchés et produits dérivés de leur transformation destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	Aflatoxine B1	2
	Aflatoxines B, B2, G1 et G2	4
Toutes les céréales et produits dérivés des céréales destinés à la consommation humaine directe (adultes)	Aflatoxine B1	2
	Aflatoxines B, B2, G1 et G2	4
lait cru, lait traité thermiquement et lait destiné à la fabrication de produits laitiers	Aflatoxine M1	0,05
Céréales brutes	Ochratoxine A	5
Grains de café torréfié moulu	Ochratoxine A	5
Café soluble	Ochratoxine A	10
Tous les produits dérivés des céréales destinés à la consommation humaine directe	Ochratoxine A	3
Vins, boisson aromatisées à base de vin, jus de raisin	Ochratoxine A	2
Jus de fruits, jus de fruits concentrés reconstitués et nectars de fruits	Patuline	50
Céréales brutes autres que le blé dur, l'avoine et le maïs	Déoxynivalénol	1250
Blé dur et avoine bruts	Déoxynivalénol	1750
Maïs brut	Déoxynivalénol	1750

Pain	Déoxynivalénol	500
Pâtes (sèches)	Déoxynivalénol	750
Céréales brutes autres que le maïs	Zéaralénone	100
Maïs brut	Zéaralénone	350
	Fumonisine B1 et B2	4000
Maïs destiné à la consommation humaine directe	Fumonisine B1 et B2	1000
Céréales petit-déjeuner à base de maïs	Fumonisine B1 et B2	800
Aliments à base de maïs pour nourrissons	Fumonisine B1 et B2	200

**Annexe 2****Composition des milieux de cultures****Potato Dextrose Agar (PDA)**

Pomme de terre.....	250 g
Glucose.....	20 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

- Laver la pomme de terre non pelée;
- Couper en cubes dans 500 ml d'eau distillée;
- Porter à ébullition pendant 30 – 45 min;
- D'autre part, faire fondre l'agar dans 500 ml d'eau distillée;
- Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar;
- Ajouter le glucose;
- Compléter le volume à 1000 ml;
- Stériliser par autoclavage à 121° C pendant 15 min.

**Solution traces de métal**

CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O.....	0,5 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	1 g
Eau distillée.....	100 ml

**Czapek concentré**

NaNO <sub>3</sub> .....	30 g
KCl.....	5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	5 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,1 g
Eau distillée.....	100 ml

**Czapek Yeast Extract Agar (CYA)**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1 g
Solution trace des métaux .....	1 ml

Czapek concentré .....	10 ml
Extrait de levure.....	5 g
Saccharose.....	30 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

Stériliser à l'autoclave à 121°C pour 15 min; le pH final est 6,7.

### **Malt Extract Agar (MEA)**

Peptone.....	1 g
Glucose .....	20 g
Extrait de malt.....	20 g
Agar.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

Stériliser par autoclavage 121° C pendant 15 min; le pH finale est 5,6.

### **25 % Glycérol Nitrate Agar (G25N)**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,75g
Czapek concentré.....	7,5 ml
Extrait de levure.....	3,7 g
Glycérol pour analyse.....	250 g
Agar.....	12 g
Eau distillée.....	750 ml

Stériliser par autoclavage 121° C pendant 15 min; le pH finale est 7,0.

### **Lactophénol**

Phénol.....	20g
Acide lactique (25%).....	20ml
Glycérol.....	20ml
Eau distillée.....	40ml

Dissoudre le phénol dans l'eau à froid et ajouter l'acide lactique et le glycérol.

**Annexe 3****Tableau A.** Cinétique de croissance d'*Aspergillus nidulans*.

<b>Jour</b>	<b>Poids sec</b>
1	1,871
2	2,42
3	4,327
4	11,451
5	13,91
6	15,254
7	16,45
8	16,302
9	16,17
10	16,166
11	16,148
12	16,131
13	15,103
14	14,132
15	12,649

**Tableau B.** Poids de foie des rats témoins et traités.

<b>Témoins</b>	<b>Traités</b>
9,1	10,24
9,34	8,78
7,85	9,39
7,7	11,65
7,54	10,67
7,81	9,15

**Tableau C.** Variation de poids corporel moyen des rats traités et témoins.

Jour	Témoins	Traités
1	199,87	190,00
2	203,75	192,13
3	206,55	193,40
4	211,3	194,30
5	215,71	195,12
6	219,60	196,33
7	223,63	197,38
8	227,43	198,15
9	230,94	198,27
10	234,04	199,14
11	237,16	200,46
12	239,73	201,13
13	241,97	202,25
14	244,12	203,17
15	246,12	203

**Tableau D.** Taux des transaminases chez les rats témoins et traités.

ALAT		ASAT	
Témoins	Traités	Témoins	Traités
114	215	153	224
101	192	114	216
94	145	105	184
104	178	132	174
117	215	131	227
129	169	151	181

# Résumés

## **Isolation of fungi producing sterigmatocystin from a food (maize) and study of its toxic effect on *Wistar albinos***

### **Abstract**

Many species of fungi are able to develop on the foodstuffs, where they synthesize and excrete the mycotoxins which are the origin of consumer's intoxications.

Three samples of imported corn were taken from various points of sale in Constantine. The isolation is carried out by the SFP method, yielded 133 fungal isolates represented in six genera: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Rhizopus* and *Mucor*. *Aspergillus* was the most frequent genus with 53.38% of all isolates. *Aspergillus nidulans* was selected for its ability to produce the STC. The identification of this isolate was realised after macroscopic and microscopic studies.

The qualitative assay by thin layer chromatography showed that all samples are exempt of STC. The production of the STC by the isolated strain was confirmed on YES medium, followed by separation and purification of the mycotoxin by thin layer chromatography, which showed red brick color spots and the  $R_f$  equal 0.65.

The *in vivo* study of toxic effect of STC was studied on *Wistar albinos*. The STC was administrated at 20 mg/kg body weight to female animals by intraperitoneally injection, for two weeks. The biochemical analysis showed a significant increase in the ALT and AST rate. Post-mortem examination to the liver of treated animals revealed the necrosis and steatosis of hepatocytes.

**Keywords:** ALT, AST, *Aspergillus nidulans*, Corn, Necrosis, Steatosis, Sterigmatocystin.

## عزل الفطريات المنتجة للـ *sterigmatocystin* من مادة غذائية (الذرة) ودراسة آثاره السامة على *Wistar albinos*

### ملخص

العديد من أنواع الفطريات قادرة، أثناء النمو على المواد الغذائية، على إنتاج وإفراز السموم الفطرية التي تسبب التسمم للمستهلك.

جمعت 3 عينات من الذرة المستوردة من نقاط بيع مختلفة بمدينة قسنطينة. تم عزل الفطريات بطريقة *SFP* التي مكنتنا من الحصول على 133 عزلة ممثلة في 6 أجناس: *Aspergillus, Fusarium, Penicillium, Alternaria, Rhizopus et Mucor*. هو النوع المهيمن بـ 53,38% من مجموع العزلات. بعد القيام بمجموعة من الدراسات المرفولوجية تم التعرف على العزلة *Aspergillus nidulans* و انتقاؤها كمنتج رئيسي للـ *STC*.

أظهر الفحص النوعي بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة بلن جميع العينات خالية من *STC*. تم التأكيد من قدرة العزلة *Aspergillus nidulans* على إفراز الـ *STC* في الوسط YES، تليها فصل وتنقية السم بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، والذي أظهر بقع ذات لون احمر قرميدي و ثابت انحباس يساوي 0.65.

الدراسة الحية لسمية الـ *STC* أجريت عن طريق الحقن اليومي لجرعة 20مغ/كغ، تحت الغشاء البيروتيني، عند جرذان بيضاء، لمدة أسبوعين. التحاليل البيوكيميائية أثبتت زيادة كبيرة في نشاط *AST, ALT*. كما أظهرت الدراسة النسيجية للكبد وجود نخر و تنكس دهني في خلايا الكبد.

الكلمات المفتاحية: *Aspergillus nidulans*، الذرة، السموم الفطرية، نخر، تنكس دهني،

*Sterigmatocystin*.

**Nom :** SAKHRI

**Prénom :** AFAF

**Thème : Isolement des mycètes producteurs de la stérigmatocystine à partir d'aliment (maïs) et étude de son effet toxique sur *Wistar albinos***

### Résumé

Plusieurs espèces de moisissures sont capables, en se développant sur les denrées alimentaires, de synthétiser et excréter des mycotoxines à l'origine d'intoxications chez le consommateur.

Trois échantillons de maïs importé ont été prélevés dans différents points de vente au niveau de la ville de Constantine. L'isolement est effectué par la méthode *SFP* qui a permis d'obtenir 133 isolats fongiques, appartenant à six genres: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Rhizopus* et *Mucor*. *Aspergillus* est le genre le plus dominant avec une fréquence de 53,38% de l'ensemble des souches isolées. *Aspergillus nidulans* est sélectionné pour sa potentialité stérigmatogène, l'identification de cette souche est obtenue sur la base des tests morphologiques macroscopiques et microscopiques.

L'analyse qualitative par CCM a révélé que tous les échantillons sont exempts de STC. La production de la STC est effectuée sur milieu YES, suivie d'une séparation et purification de la mycotoxine par CCM, ce qui a révélé des spots de couleurs rouge brique et d'un  $R_f$  égal à 0.65.

L'étude, *in vivo*, de l'effet toxique de la STC est effectuée par l'injection quotidienne d'une dose de 20 mg/kg, par voie intrapéritonéale et pendant deux semaines. Les analyses biochimiques ont révélé une augmentation significative des taux des paramètres biochimiques explorés au niveau sériques (ALAT, ASAT). Ainsi, l'étude histologique du foie a révélé des lésions de nécroses et de stéatoses au niveau des hépatocytes.

**Mots clés :** ALAT, ASAT, *Aspergillus nidulans*, Maïs, Nécrose, Stéatose, Stérigmatocystine.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (FSNV, Université Mentouri-Constantine).

### Membres de jury :

**Président:** Mr. DEHIMAT L. Prof. Université Mentouri, Constantine.

**Rapporteur:** Mr. KACEM CHAOUICHE N. Prof. Université Mentouri, Constantine.

**Examineurs:** Mr. BENSEGUENI A. M.C.A. Université Mentouri, Constantine.

Mr. CHIKHI A. M.C.A. Université Mentouri, Constantine.

**Année universitaire : 2011-2012**