



لجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



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

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الميكروبيولوجيا

Département : Microbiologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie Fongique / Fermentation et production de substances fongiques

Intitulé :

Extraction et identification de mycotoxines de *Penicillium chrysogenum*.

Présenté et soutenu par : Behnas Djihad

Le : 24/06/2015

Benayache Amina

Jury d'évaluation :

Président : KACEM CHAOUCHE N.

(Prof - UMC Constantine).

Rapporteur : LAHLAH F.Z.

(M.A.A - UMC Constantine).

Examineur : KARA ALI M.

(M.A.A - UMC Constantine).

Année universitaire
2014 - 2015

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier **Dieu** tout puissant, qui en son nom et avec sa protection, nous avons réussi à réaliser ce travail.

Nous tenons aussi à présenter nos vifs remerciements et notre respect au jury pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de juger ce mémoire :

M^r KACEM CHAOUCH N. En tant que président du jury

M^{elle} KARA ALI M. en tant qu'examinatrice

Nos profonds remerciements et notre gratitude s'adressent à notre encadreur **M^{elle} LAHLAHF.Z** pour sa précieuse aide, ses orientations et le temps qu'elle nous a accordé pour notre encadrement.

Nous remercions également l'ensemble du personnel du laboratoire de Microbiologie et de Zoologie.

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à l'ensemble de tous nos enseignants qui ont contribué dans notre formation de long de notre parcours pédagogique. Nous spécifions ceux qui nous ont dirigé et encadré principalement en licence et en master.

Dédicaces

Je remercie, tout d'abord, Dieu tout puissant De m'avoir donné la force et le courage pour accomplir ce modeste travail que je dédie :

A mes chers parents que j'aime tant, sans lesquels je ne serai jamais arrivée là où j'en suis.

A mon unique frère AMAR et mes charmantes sœurs AKILA et FATIMA ZOHRÀ et toute ma famille.

A mes enseignants ainsi qu'à tous les étudiants de ma promotion.

A tous ceux que j'aime.

AMINA

Dédicaces

Je remercie, tout d'abord, Dieu tout puissant, pour avoir guidé mes pas vers un avenir inchaallah prometteur.

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents pour leur encouragement et leur soutien moral.

A mes belles sœurs Choubeila, Hanen, Narimen et mon frère unique Walid.

A mes deux belles nièces Takwa et Maya.

A tous mes amies et tous ceux qui j'aime.

Djihad

Liste des abréviations

AFB1: Aflatoxine B1

AFB2: Aflatoxine B2

AFG1: Aflatoxine G1

AFG2: Aflatoxine G2

AFM1: Aflatoxine M1

AFM2: Aflatoxine M2

A_w : Activité de l'eau

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CEA : Coconut Extract Agar

°C : Degré Celcusse

DON : Déoxynivalénol

FB1: Fumonisine B1

FB2: Fumonisine B2

FB3: Fumonisine B3

FAO: Food and Agriculture Organization

HPLC: Chromatographie liquide haute performance

HT-2: Toxine HT-2

OTA : Ochratoxine A

pH : potentielHydrogène.

RF : Rapport Frontal

T-2 : Toxine T-2

UV : Ultra-Violet

ZEA : Zéaralénone

Liste des figures

- Figure 1** Représentation schématique de l'hyphe.
- Figure 2** Cycle de vie d'une moisissure.
- Figure 3** Caractères macroscopique de *Penicillium chrysogenum*.
- Figure 4** Caractères microscopique de *Penicillium chrysogenum*.
- Figure 5** Structure chimique des aflatoxines.
- Figure 6** Structure chimique de l'ochratoxine A.
- Figure 7** Structure générale des fumonisines.
- Figure 8** Structure générale semi développée des trichothecenes.
- Figure 9** Structure chimique de la zéaralène.
- Figure 10** Structure de fungisterol.
- Figure 11** Structure de la roquefortine C.
- Figure 12** Structure chimique de l'acide cyclopiazonique.
- Figure 13** Fruits d'oranges contaminés.
- Figure 14** Schéma représente la Chromatographie sur Couche Mince.
- Figure 15** *Penicillium chrysogenum* isolé sur milieu Sabouraud.
- Figure 16** Aspect macroscopique de la souche sur milieu Sabouraud.
- Figure 17** Observation sous UV à 365nm des boites de *Penicillium chrysogenum* productrices des mycotoxines.
- Figure 18** La plaque (CCM) après révélation sous UV et après révélation à la ninhydrine.
- Figure 19** Nos Profile HPLC des mycotoxines de *Penicillium chrysogenum*.
- Figure 20** Profile HPLC des mycotoxines de *Penicillium chrysogenum*.

Liste des tableaux

Tableau 1 Classification de *Penicillium chrysogenum*.

Tableau 2 Exemples de mycotoxines produites par certaines moisissures.

Tableau 3 Mycotoxines produites par certains champignons.

Tableau 4 Caractères morphologiques de la souche *P. chrysogenum*.

Tableau 5 Caractères microscopiques de la souche *P. chrysogenum*.

Tableau 6 L'effet des mycotoxines sur la bactérie *Escherichia coli*.

Table des matières

1-Introduction	1
2-Etude bibliographique	2
2.1- Les champignons	2
2.1.1- Généralités.....	2
2.1.2- Morphologie	3
2.1.3- Conditions de croissance	3
2.1.3.1-Eléments nutritifs.....	3
2.1.3.2-Facteurs physicochimiques.....	5
2.1.4- Ecologie	7
2.1.5- Modes de reproduction.....	7
2.2-<i>Penicillium chrysogenum</i>.....	9
2.2.1- Définition.....	9
2.2.2- Classification	9
2.2.3- Caractères cultureux	9
2.2.4- Caractères microscopiques	10
2.2.5- Ecologie	10
2.2.6- Utilisation industriel	10
2.3-Les mycotoxines	12
2.3.1- Généralités.....	12
2.3.2- Effets des mycotoxines.....	13
2.3.3- Champignons producteurs de mycotoxines.....	14

2.3.4- Facteurs influençant la toxinogènes	14
2.3.4.1- Facteurs intrinsèques	14
2.3.4.2- Facteurs extrinsèques.....	15
2.3.4.3- Facteurs divers.....	17
2.3.5- Les principales mycotoxines	17
2.3.5.1- Les aflatoxines.....	17
2.3.5.2- L'ochratoxine A.....	18
2.3.5.3- Les fumonisines.....	18
2.3.5.4- Les trichothécènes	19
2.3.5.5- La zéaralénone	20
2.3.6- Mycotoxines produites par <i>Penicillium chrysogenum</i>	20
2.3.7- Méthodes d'analyses des mycotoxines	20

3-Matériel et Méthodes.....22

3.1- Prélèvement de l'échantillon	22
3.2- Isolement de <i>Penicillium chrysogenum</i>	22
3.3- Purification de la souche	23
3.4- Identification de la souche.....	23
3.4.1- Identification macroscopique	23
3.4.2- Identification microscopique	23
3.5- Mise en culture et extraction des mycotoxines	24
3.5.1- Mise en culture de <i>P. chrysogenum</i> sur milieu solide	24
3.5.2- Extraction des mycotoxines.....	24
3.6- Test d'antibiose	24
3.7- Identification des mycotoxines.....	25
3.7.1- Chromatographie sur Couche Mince (CCM)	25

3.7.2- Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)..... 25

4-Résultats et Discussion27

4.1-Isolement et purification de l'isolat fongique27

4.2- Identification des souches27

4.2.1- Identification macroscopique 27

4.2.2- Identification microscopique 28

4.3- Mise en culture et extraction des mycotoxines30

4.4- Test d'antibiose30

4.5- Identification des mycotoxines.....31

4.5.1- Chromatographie sur Couche Mince (CCM) 31

4.5.2- Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)..... 32

5-Conclusion.....33

6- Résumé34

7- Abstract.....35

8-ملخص.....36

9-Références bibliographiques.....37

10-Annexes50

Introduction

1-Introduction

Les moisissures sont des champignons microscopiques qui ont des actions bénéfiques mais aussi néfastes pour l'homme. Plusieurs moisissures, notamment les genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, sont connus pour être des contaminants des produits agricoles et/ou pour leur capacité à produire des métabolites toxiques : mycotoxines (Cahagnier et *al.*, 1998).

En effet, 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).

Elles ont selon leurs structures chimiques des effets immunodépresseurs, hémorragiques, hépatotoxiques, néphrotoxiques, neurotoxiques, oestrogéniques ainsi que, à plus long terme et pour certaines, des effets mutagènes et cancérigènes (Cahagnier et *al.*, 1998).

L'objectif de notre travail est la recherche des mycotoxines à partir des fruits d'oranges contaminés par *P. chrysogenum*. En effet, le travail s'articule sur :

- L'isolement de souches fongiques productrices des mycotoxines *P. chrysogenum*;
- La purification et l'identification de la souche ;
- La mise en culture de *P. chrysogenum* sur milieu solide ;
- L'extraction des mycotoxines (utilisation de solvants organiques) ;
- Test d'antibiose ;
- Chromatographie : CCM, HPLC .

*Etude
bibliographique*

2-Etude bibliographique

2.1- Les champignons

2.1.1- Généralités

Les champignons représentent un des groupes d'organismes vivants les plus abondants mais dont il reste beaucoup à découvrir, autant du point de vue de la diversité que de leurs applications possibles pour la société et les écosystèmes. En effet, un peu plus de 99 000 espèces seulement sur 3,5 à 5,1 millions estimées en 2005 auraient été décrites (O'Brien, 2005 ; Blackwell, 2011).

Le règne fongique comprend les moisissures, les lichens, les rouilles et les levures. Ils présentent des structures et modes de vie différents et possèdent un rôle important dans les écosystèmes. Dans la mesure où ils peuvent être utilisés pour des applications industrielles ou médicales, ils font l'objet de nombreuses études.

Les champignons sont des Eucaryotes possédant une paroi constituée de chitine qui est un polysaccharide composé de résidus N-acétylglucosamine, de glucanes et de mannoprotéines variées. Ils sont en général aérobies même si certaines levures peuvent être aéro-anaérobies lors de processus fermentaires. Leur structure cellulaire varie et deux catégories principales sont distinguables : la forme unicellulaire, c'est le cas des levures, et la forme mycélienne pluricellulaire constituée d'hyphes. Parfois, des espèces dites « dimorphiques » peuvent présenter les deux formes selon les conditions environnementales, ce qui présente des avantages pour la colonisation de certains milieux. Ainsi, par exemple, la forme mycélium est plus adaptée à une croissance dans un milieu donné tandis que la forme levure est plus adaptée à la colonisation d'un tissu animal et ce, dépendamment de la température (Carlile, 1994 ; Vega, 2012).

Les organismes unicellulaires ont l'avantage de pouvoir subir une pression osmotique plus forte, tandis que les mycéliens peuvent coloniser très rapidement un milieu du fait de leur surface de contact optimale pour la recherche et l'assimilation de nutriments (Jennings, 1996). Le mycélium est donc constitué d'hyphes ramifiés et peut générer un tissu macroscopique appelé « thalle » qui peut s'étendre parfois sur plusieurs centaines d'hectares (Ferguson, 2003). Leur croissance se réalise par

l'allongement de leurs hyphes grâce à une extension de la paroi au niveau de l'apex par un apport continu de chitine (Carlile, 1994; Glass, 2004). Possédant un génome de petite taille comparé à d'autres Eucaryotes (30 à 40 Mb en moyenne), la plupart a été rapidement séquencé lors du projet « 1000 génomes fongiques » du Joint Genome Institute (Grigoriev, 2011). Certaines espèces étant faciles à cultiver et connaissant leur patrimoine génomique, les champignons sont aussi beaucoup étudiés pour comprendre les processus moléculaires du fonctionnement cellulaire des Eucaryotes.

2.1.2- Morphologie

Le mycète est constitué d'un thalle qui forme son appareil végétatif (Hawksworth et *al.*, 1994). L'appareil végétatif se compose d'éléments de base appelé hyphe qui forme un réseau de filaments ramifiés ; le mycélium (Mathew, 1995).

Chez la plupart des mycètes, les hyphes sont divisés par des cloisons, ou septa (septum au singulier) formant des unités qui ressemblent à des cellules distinctes avec un seul noyau, on les appelle alors hyphes segmentés ou septés. Dans quelques classes de mycètes, les hyphes ne contiennent pas des cloisons et ont l'aspect de longues cellules continues à noyau multiples ; ils sont appelées cénocytes (Figure 1) (Tortora et *al.*, 2003).

Les hyphes, segmentés ou non, sont en fait de petits tubules transparents entourés d'une paroi cellulaire rigide formée de polymère de chitine et des polymères de la cellulose, éléments chimiques qui lui confèrent une grande rigidité, une longévité et une grande capacité de résistance à la chaleur et à des pressions osmotiques élevées. De ces faits, les mycètes sont donc capables de vivre dans un environnement rude (Tortora et *al.*, 2003).

En effet, les mycètes se développent à pH légèrement acide (3 et 7) et à une température optimale comprise entre 20°C et 30°C, cependant certaines espèces sont psychrophiles, se développant à des températures très basses (<15°C ou même parfois à <0°C) (Botton et *al.*, 1990 ; Guiraud, 1998).

2.1.3- Conditions de croissance

2.1.3.1- Eléments nutritifs

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes, elles exigent donc la présence des éléments nutritifs de base (carbone, azote et ions minéraux) dans le milieu qui assure leur croissance. Les moisissures possèdent une panoplie enzymatique extrêmement riche qui leur permet d'utiliser plus efficacement encore que les bactéries les substrats les plus complexes. Leur digestion doit commencer dans le milieu extérieur par des enzymes excrétées (extracellulaires) ou liées à la paroi, car seules les molécules de taille relativement petite peuvent franchir les parois et gagner le cytoplasme (Davet, 1996).

- **Source de carbone et d'énergie**

Pratiquement tous les composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie par les moisissures. La plupart d'entre elles peuvent métaboliser le glucose et le saccharose avec quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (Boiron, 1996 ; Nicklin *et al.*, 2000). Certaines d'entre elles produisent des lipases extracellulaires capables d'hydrolyser les lipides en glycérol et acides gras qui peuvent être assimilés par beaucoup d'espèces fongiques, alors que seulement certaines espèces utilisent les acides organiques et l'éthanol (Boiron, 1996).

- **Source d'azote**

La plupart des moisissures assimilent l'ammoniaque sous forme de sels (NH_4^+) dont la présence réprime l'utilisation d'autres sources azotées (nitrate, acides aminés, protéines). L'ammoniaque est transformé en acide glutamique, en glutamine ou en d'autres acides aminés par transamination, alors que seules certaines espèces utilisent le nitrate, d'autres ne peuvent croître qu'en présence d'azote organique et aucune moisissure ne peut fixer l'azote atmosphérique (Boiron, 1996).

- **Eléments minéraux**

La présence des ions minéraux et métaux dans le milieu de culture est nécessaire pour la croissance et la reproduction de plusieurs espèces fongiques, il s'agit essentiellement de sulfate, de magnésium, de potassium, de sodium et de phosphore avec des concentrations plus au moins différentes selon l'espèce (Uchicoba *et*

al.,2001). Des traces d'éléments tels que le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène, sont nécessaires à la plupart des moisissures pour la production des cytochromes, des pigments, des acides organiques, etc (Boiron, 1996).

2.1.3.2- Facteurs physicochimiques

Les facteurs physicochimiques ont une grande influence sur le développement des moisissures ainsi que sur la germination, nous examinerons successivement quelques paramètres importants.

- **Température**

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (Bourgeois, 1989). La plupart des moisissures sont mésophiles avec des optima de croissance de 25 à 35°C (Botton et *al.*,1999 ;Julien, 2002).

Quelques espèces sont thermotolérantes ou thermophiles et peuvent croître à haute température au-dessus de 50°C avec une croissance optimale aux environ de 20 à25°C, *Aspergillus fumigatus* est un bon exemple (Botton *etal.*,1999 ; Nicklin et *al.*, 2000).

D'autres sont des psychrophiles ou psychrotolérantes se développant à basses températures (entre -5 et 10°C) tels que *Helicostylum pulchrum*, *Chrysosporium pannorum* et *Cladosporium herbarum*, ces espèces peuvent survivre même à -60°C, on les rencontre dans des entrepôts frigorifiques (Davet, 1996 ; Botton et *al.*,1999).

- **Humidité**

Les moisissures ont en général un besoin en eau faible par rapport aux autres microorganismes (Davet, 1996). Néanmoins, l'humidité a une grande influence sur le développement des moisissures non seulement sur la croissance mycélienne et la sporulation mais plus particulièrement sur la germination des spores (Bourgeois, 1989).

Les moisissures à mycélium non cloisonné sont les plus sensibles à la dessiccation ; leur développement cesse lorsque le potentiel hydrique descend au-dessous de - 4 MPa (méga pascal). Les moisissures à mycélium cloisonné supportent en moyenne

jusqu'à - 10 MPa. Cependant, les *Aspergillus* et les *Penicillium* peuvent en général se développer à des potentiels hydriques de l'ordre de - 20 MPa (Davet, 1996).

- **pH**

La grande majorité des champignons filamenteux se développent dans une zone de pH de 4.5 – 8.0 (Botton et al., 1999), bien qu'ils soient capables de croître dans une large gamme de pH avec une tendance à croître dans des milieux légèrement acide. C'est le cas de *Fusarium culmorum*, *Trichoderma harzianum* et *Aspergillus oryzae* (Urbanek et al., 1984 ; Delgado-Jarana et al., 2002).

Cependant, les enzymes extracellulaires produites dans des milieux complexes peuvent avoir des optima de pH d'activité très différents (plus acides ou plus basiques) (Botton et al., 1999). Le pH influe sur la croissance de ces microorganismes soit indirectement en agissant sur la disponibilité des éléments nutritifs (à pH acide, le fer reste sous forme d'ions ferreux assimilable), soit directement par action sur la membrane cellulaire. Par ailleurs, les champignons modifient souvent le pH du milieu par absorption sélective et échange d'ions, production de CO₂ ou de NH₃ ou par production d'acides (Boiron, 1996).

- **Oxygène**

La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important de développement. La plupart sont aérobies, les plus exigeantes vivent dans les régions périphériques des substrats, les moins exigeants peuvent se développer en profondeur comme *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus fumigatus*. Certaines peuvent même supporter une anaérobiose très stricte comme *Neocallimastix* (Bourgeois, 1989 ; Botton et al., 1999).

- **Lumière**

Les radiations du spectre visible (380 – 720) n'ont en général pas d'action sur la croissance végétative des champignons mais peuvent agir sur la sporulation. La plupart des moisissures n'exigent pas de lumière pour leur croissance, ni pour la germination de leurs spores (Botton et al., 1999).

2.1.4- Ecologie

Les champignons ont développé des adaptations très diverses, de telle sorte qu'on les trouve dans pratiquement tous les milieux du monde. Les plus répandues sont les *Penicillium* et les *Aspergillus*. On les trouve sous tous les climats et sous toutes les latitudes (Florent, 1993 ; Tachenon, 1999).

Quelque espèces sont adaptées à la sécheresse, d'autres vivent au contraire dans l'eau (eau douce, océans, ou eaux usées). Certains supportent bien des pressions osmotiques élevées (dans les milieux très salés, ou très sucrés, par exemple) et arrivent à contaminer les salaisons, le miel, ou les confitures. Des champignons aimant la chaleur se trouvent dans les composts à (70-75°C) Mais on trouve aussi des champignons dans les toundras arctiques ; en haute montagne, l'hygrophore printanier se récolte à la fonte des neiges (2°C) ; et certains champignons peuvent encore pousser dans les chambres réfrigérées (*Sporotrichum carnis*) peut altérer des viandes pourtant conservées à (-5°C).

Dans des conditions défavorables (froid ou chaleur intense, manque d'eau), ce sont des spores particulières qui constituent les formes de résistance (pouvant régénérer un mycélium plusieurs dizaines d'années après sa formation). Étant donné leur mode de nutrition, les champignons peuvent, à la différence des autres végétaux, pousser dans une obscurité complète (grotte). Ils peuvent aussi vivre à des profondeurs de 3200 m dans le sol (Locquin, 1984 ; Tachenon, 1999).

2.1.5- Modes de reproduction

La plupart des champignons possèdent deux modalités de reproduction : la reproduction asexuée (imparfaite ou végétative), et la reproduction sexuée (parfaite) (Larousse Agricole, 1981) (Figure 2).

La reproduction végétative des champignons résultant d'une fragmentation du thalle ou d'une sporulation représente le plus souvent la principale source de dissémination du parasite lors de la fragmentation du thalle. Les ramifications se séparent les unes des autres à la suite de la dégénérescence de la partie basale d'hyphe dont elles dérivent. Il est rare que l'ensemble du cytoplasme du thalle se transforme en spores lors de la multiplication végétative (thalle holocarpique de certaines chytridiales).

Généralement, le contenu d'un territoire du thalle est isolé du reste de celui-ci par une cloison qui engendrera des spores en constituant un sporocyste (thalle eucarpique).

La reproduction sexuée des champignons comporte une plasmogamie (fusion des Cytoplasmes de deux gamètes) suivie d'une caryogamie (fusion des noyaux correspondants) et d'une méiose (division réductionnelle). Les types de spores sexuées sont au nombre de quatre : l'oospore, la zygosporé, l'ascospore et la basidiospore (Stanier et *al.*, 1966).

Chez des nombreuses espèces les hyphes laissent apparaître des cloisons transversales qui rassemblent ainsi, les segments en une chaîne de cellules séparées les unes des autres, cet aspect n'est en fait que une apparence car toutes les cellules communiquent par un pore centrale qui laisse le cytoplasme multinuclé circuler librement. Le mycélium bien que contenant un cytoplasme mobile, et lui-même incapable de se déplacer à cause de la rigidité de ses parois. On parle aussi communément des moisissures pour désigner les champignons chez lesquels les organes de fructification on une structure nettement filamenteuse. Elles s'opposent aux champignons comestibles ; dans les corps fructifiant sont charnus (Leclerc et *al.*, 1983).

2.2- *Penicillium chrysogenum*

2.2.1- Définition

Penicillium chrysogenum est classé par Pitt dans la série Expansa de la section *penicillium* du sous genre *penicillium* (Pitt, 1979). Elle possède de nombreuses espèces synonymes. (Pitt, 2000) telles que : (*P. griseoroseum*, *P. notatum*, *P. cyaneofulvum*, *P. camerunense*, *P. harmonense*).

2.2.2- Classification

Tableau 1 Classification de *Penicillium chrysogenum* (Thom, 1910).

Règne	Champignons
Division	Ascomycota
Classe	Eurotiomycetes
Ordre	Eurotiales
Famille	Trichomaceae
Genre	<i>Penicillium</i>
Espèce	<i>Penicillium chrysogenum</i>

2.2.3- Caractères cultureux

Penicillium chrysogenum se développent rapidement et atteignent, à 25 °C sur gélose de Czapek, un diamètre de 4-5 cm en dedans de dix jours.

Les colonies sont plates et de texture veloutée à ouatée ; elles sont blanches ou vert-jaune pâle, puis bleues et vertes, olive grisâtre (vert-de-gris), jaunes ou même rosâtres. Avec le temps, une large frange soulevée blanche de mycélium peut apparaître au pourtour de la colonie, et, en surface, il peut y avoir de nombreuses gouttelettes d'exsudat souvent jaunes ou parfois diaphanes (Figure 3).

L'odeur qui s'en dégage est habituellement aromatique, fruitée. Le revers de la colonie est le plus souvent de blanc à jaunâtre ou blanc-jaune (Cardinal,2003; Patterson et McGinnis,2009 ; Ellis, 2007 ; Samson et Hoekstra,1984).

Cette espèce est de plus capable de se développer à 37°C et avec une faible activité en eau (a_w minimale= 0,78-0,8).

2.2.4- Morphologie microscopique

Les conidiophores sont constitués d'un stipe lisse portant un pénicille terverticillé produisant des colonnes irrégulières de conidies ellipsoïdales lisses et de couleur verte (Figure 4). Elle possède des similarités morphologiques avec (*P. expansum* et *P. brevicopactum*) et une affinité avec (*P. citrinum*) (Pitt, 1979)

2.2.5- Ecologie

Penicillium chrysogenum est une espèce ubiquiste, retrouvée dans des substrats très divers avec une distribution mondiale. Elle est considérée comme l'espèce la plus largement distribuée et serait l'une des formes de vie eucaryotes les plus répandues sur la planète (Pitt, 2000).

En dehors des habitats naturels, des souches ont pu être isolées d'une variété d'aliments et s'agit de la moisissure la plus communément retrouvée dans les environnements intérieurs (Nielsen et Smedsgaard, 2003 ; Samson et *al.*, 2004).

Cette espèce semble également bien présente en milieu marin. Des études sur la microfonge marine ont mis en évidence sa présence dans différents prélèvements : des échantillons de sol marais salants en Slovénie, de sable de plages du Brésil, de glace et d'eau de mer de Svalbard en Arctique, mais aussi d'un invertébré marin de Méditerranée (l'éponge *Ircinia fasciculata*), et elle a été listée parmi les fongiques retrouvées dans les marins européens (de Moura Sarquis et de Oliveira, 1996 ; Gunde-Cimerman et *al.*, 2001 ; Bringmann et *al.*, 2005 ; Gunde-Cimerman et *al.*, 2005 ; Landy et Jones, 2006).

2.2.6- Utilisation industriel

Penicillium chrysogenum une espèce commune de *Penicillium* est la source bien connue de la pénicilline. En 1928, des cultures bactériennes du chercheur Alexandre Fleming ont été souillées par les spores aéroportées d'une moisissure verte. Sir Fleming a noté que les bactéries ne se développaient pas près de la moisissure verte. Il a conclu que la moisissure produisait un composé qui tuait ou empêchait la croissance

des bactéries. Voici comment la pénicilline, le plus ancien et le plus connu de tous les antibiotiques, a été accidentellement découverte.

2.3- Les mycotoxines

2.3.1- Généralités

Longtemps confiné aux pathologies provoquées par l'ergot de seigle et par des champignons macroscopiques, le problème des mycotoxines a pris une importance considérable dans les années 1960 lorsque la découverte des aflatoxines a révélé que certaines moisissures étaient capables de synthétiser des substances toxiques responsables de pathologies chez l'homme. En effet en 1960, en Angleterre, une maladie "Turkey X disease" maladie X des dindons provoque la mort de grands élevages de volailles (100 000 à 200 000) avec une hépatite nécrosante. L'accident était associé à la consommation par les animaux d'une farine d'arachides importée du Brésil (Bradburn et *al.*, 1994).

Dès 1961, la toxicité des farines d'arachide était établie comme due à des facteurs produits par l'*A. flavus*. La substance responsable, obtenue sous forme cristallisée stable, fut nommée Aflatoxine. Depuis cette découverte, qui a bouleversé un certain nombre de croyances et ébranlé quelques certitudes, de très nombreux laboratoires à travers le monde se sont reconvertis pour l'étude de ce nouveau phénomène et ainsi plusieurs mycotoxines ont été découvertes (Pitt, 1998). Les mycotoxines sont des métabolites secondaires peu volatiles, élaborés par diverses moisissures sous certaines conditions environnementales. A l'heure actuelle seules certaines espèces de moisissures sont connues comme ayant la capacité de produire des toxines. Leur biosynthèse est dépendante de plusieurs facteurs, dont la température, l'intensité lumineuse, le dioxyde de carbone dans l'air, les éléments nutritifs disponibles et la présence et la présence d'autres espèces en compétition (Hendey et Cole, 1993).

Les mycotoxines se retrouvent dans le mycélium et les spores et peuvent diffuser dans le substratum. Plusieurs de ces toxines sont relativement stables et leur toxicité peut persister longtemps et ce même lorsque les cellules fongiques ne sont pas viables. Il faut toutefois noter qu'il n'existe actuellement pas de données sur la durée précise de cette toxicité. Il y aurait, selon les auteurs, jusqu'à 400 mycotoxines répertoriés (Etzel, 2002).

Le nombre exact de mycotoxines peuvent se retrouver sur des matériaux contaminés n'a pas été établi, néanmoins, plusieurs études en cours d'identification, dans des conditions expérimentales ou naturelle (Nielson et *al.*, 1999). Chaque mycotoxines n'est pas nécessairement spécifique à une moisissure donnée. La gliotoxine, par exemple : peut aussi bien être produite par *Aspergillus fumigatus* que par *Trichoderma viridae*. De même, une moisissure donnée peut produire plusieurs toxines ; *Aspergillus fumigatus*, agent étiologique de certaines atteintes pulmonaires, fabrique plus de huit toxines différentes (Maheux, 1998).

Six groupes de mycotoxines sont produits par trois principaux types de champignons : *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. De structure chimiques différentes ; cancérogènes, mutagènes, oestrogénique, neurotoxique, ou immuno-supressif (Jouany, 2002). (Tableau 2) récapitule la majorité des mycotoxines répertories.

2.3.2- 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. 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 (Brochard et Le Bâcle, 2009 ; Pamel et *al.*, 2010).

2.3.3- Champignons producteurs de mycotoxines

L'élaboration des mycotoxines par certains champignons toxigènes peut se faire à tous stades de la chaîne alimentaire depuis le champ jusqu'au produit fini. Celles-ci peuvent survenir au champ (avant récolte), lors du transport, pendant la transformation ou au cours de toutes ces périodes. Les mycotoxines peuvent être présentes alors que l'agent responsable a disparu, soit du fait de l'évolution de microflore, soit du fait de traitements technologiques.

En effet, lorsqu'elles sont produites dans les matières alimentaires, leur décontamination est très difficile, par conséquent, ces molécules ne sont pas détruites au cours d'un stockage prolongé et sont souvent résistantes aux traitements thermiques ou chimiques (Langseth et *al.*, 1995 ; Cahagnier et *al.*, 1998).

Toutefois, la présence de champignons ne signifie pas nécessairement l'élaboration de mycotoxines, mais qu'un potentiel de production existe. Cependant, plusieurs facteurs d'ordre biologique, physique et chimique conditionnent la mycotoxinogénèse (D'Mello et Macdonald, 1997).

La nature et la quantité des mycotoxines produites dépendent des espèces fongiques, des conditions écologiques (Tableau 3) et de la stabilité de ces toxines dans les milieux alimentaires.

2.3.4- Facteurs influençant la toxigénèse

2.3.4.1- Facteurs intrinsèques

Les mycotoxines sont essentiellement élaborées par des espèces appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*. Certaines mycotoxines peuvent être produites par plusieurs espèces appartenant à des genres différents. Par exemple l'ochratoxine A (OTA) est produite par *Penicillium nordicum*, *P. verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* et *A. carbonarius*. De même, une espèce peut élaborer plusieurs mycotoxines. Par exemple l'acide penicillique et l'OTA sont produits par *A. ochraceus* (Van der Merwe et *al.*, 1965; Olsen et *al.*, 2003). Cependant certaines mycotoxines sont étroitement liées à certaines espèces fongiques : aflatoxines (*A. flavus* et *A. parasiticus*), sporidesmines. Au sein d'une même espèce réputée toxigène, toutes les souches n'ont cependant pas cette propriété. Le type et la

quantité de mycotoxine dépendent des espèces qui les produisent (Lacey, 1986 ; Fitzerald *et al.*, 1998). Elles se différencient dans leur caractère morphologique, génétique et dans leur place écologique (Cast, 2003).

Les champignons toxigènes peuvent être classés en deux groupes principaux selon Christensen (1974):

- ❖ Les champignons de champs qui contaminent les produits agricoles avant et pendant la récolte, principalement *Fusarium* et *Alternaria* mais aussi des *Aspergillus* dans le cas des raisins.
- ❖ Les champignons de stockage (par exemple *Penicillium* et *Aspergillus*) qui tendent à contaminer les denrées alimentaires pendant le stockage.

2.3.4.2- Facteurs extrinsèques

- **Disponibilité en eau (A_w)**

La disponibilité en eau a une influence déterminante sur le développement du champignon ainsi que sur sa production de mycotoxines, notamment dans les denrées peu hydratées comme les céréales, les grains de café. Dans ce cas, la toxino-génèse semble proportionnelle à l'activité de l'eau (Cahagnier *et al.*, 1998).

La plupart des moisissures préfèrent une A_w entre 0.85 et 0.99 pour leur développement. L' A_w minimale permettant le développement de la plupart des champignons contaminant les céréales est de (0.7). Certaines moisissures xérophiles (*A. flavus* ou *P. restrictis*) peuvent se développer dans les fruits secs, le lait en poudre, les confitures, les charcuteries sèches dont l' A_w est moindre (Le Bars et Le Bars, 1987 ; Bourgeois *et al.*, 1996).

Généralement les espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* sont des contaminants typiques des céréales au stockage tandis que les espèces de *Fusarium* préfèrent le milieu dont l' A_w est plus élevée (Pardo *et al.*, 2004).

- **Température**

Les moisissures peuvent se développer entre 0 et 35°C. Certaines espèces sont capables de se développer à des températures extrêmes : *Cladosporium herbarum* peut se développer à des températures inférieures à 0°C et *A. flavus* ou *A. fumigatus* jusqu'à 60°C. En général, la température optimale de toxino-génèse est voisine de la température optimale de croissance. Pour d'autres toxines, telles que la zéaralénone

élaborée par *F. roseum*, la température optimale de toxinogénèse est généralement inférieure à celle de la croissance, respectivement 15 et 25°C environ. Parfois l'apparition de mycotoxines dans les conditions naturelles est favorisée par des températures relativement basses, au voisinage de la température minimale de croissance : de l'ordre de 1 à 4°C pour les trichothécènes produites par *F. tricinctum* (Bourgeois et *al.*, 1996).

- **Composition gazeuse**

La plupart des moisissures sont aérobies. La réduction de la pression partielle en oxygène et surtout l'accroissement de la teneur en CO₂ ont un effet dépresseur important sur la toxinogénèse. La production d'aflatoxines dans l'arachide, modérément réduite entre 21 et 5% d'O₂, est pratiquement inhibée lorsque la proportion en O₂ est inférieure à 1% (Le Bars et Le Bars, 1987).

L'augmentation de la teneur en CO₂ (20%), surtout si elle est associée à une réduction en oxygène, provoque une chute importante de la production d'aflatoxines. Après conservation dans une atmosphère confinée, dans laquelle les moisissures peuvent plus ou moins se développer, la remise à l'air libre ou la ventilation provoque rapidement une intense toxinogénèse (Le Bars et Le Bars, 1987).

- **Nature du substrat du milieu**

La toxinogénèse des moisissures en comparaison à leur croissance dépend beaucoup de la composition chimique de la denrée sur laquelle elles se développent. Sur une denrée alimentaire, on trouve souvent une espèce dominante donc ses toxines. Par exemple, *P. verrucosum* est le producteur principal d'OTA dans les céréales tandis que *P. nordicum* contamine souvent les produits riches en protéines, des produits fermentés à base de viande, de fromages (Lund et J.C, 2003).

ainsi, les céréales sont, toutes conditions égales par ailleurs, beaucoup plus propices à la toxinogénèse que le soja, le colza et les protéines d'origines animales (saucisson, jambon) (Lund et J.C, 2003).

2.3.4.3- Facteurs divers

Les fourrages et les céréales sont naturellement en contact avec des spores fongiques avant, pendant et après la récolte, durant le transport et le stockage. Les rongeurs, oiseaux, insectes et acariens interviennent dans le processus de contamination en provoquant des lésions physiques dans les tissus végétaux qui favorisent la pénétration des spores (Le Bars et Le Bars, 1982).

La contamination d'arachide, de coton, de maïs par *A. flavus* ou les aflatoxines avant la récolte est souvent liée à l'attaque par les insectes. Dans le stockage, les échantillons de grain hébergeant des charançons révèlent en général une population fongique importante et parfois des mycotoxines (aflatoxine B1, ochratoxines A, citrinine dans le maïs ou l'orge). Des microorganismes dits « de concurrence » peuvent affecter la production de mycotoxines sur les produits agricoles. Ils peuvent augmenter ou gêner la formation des mycotoxines en changeant les conditions environnementales les rendant défavorables pour la production de mycotoxines ou en produisant des composés inhibiteurs (Lacey, 1986). Les interactions avec d'autres microorganismes peuvent également être différentes dans les différentes conditions environnementales (Marin et *al.*, 1998 ; Cairns et *al.*, 2003).

Plusieurs facteurs additionnels peuvent influencer la production des mycotoxines dans le champ. Il peut s'agir des pratiques agricoles comme le labourage et la rotation de récolte (Lipps et Deep, 1991), les fongicides utilisés (Moss et Frank, 1985), la variété de la plante (Golinski et *al.*, 1996) et les différences géographiques (Langseth et *al.*, 1995).

2.3.5- Les principales mycotoxines

Les principales mycotoxines peuvent être produites par 5 types de champignons : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria*. Compte tenu de leurs propriétés toxiques chez l'homme et l'animal et de leur fréquence de contamination des matières premières et des aliments, les mycotoxines les plus importantes sont les aflatoxines, l'ochratoxine A, les fumonisines, les trichothécènes et la zéaralénone.

2.3.5.1- Les aflatoxines

Les aflatoxines sont des toxines produites par *A. flavus* (qui produit aussi de l'aflatrem, de l'acide cyclopiazonique et de l'acide aspergillique) et *A. parasiticus*.

Les aflatoxines (B1, B2, G1, G2, M1, M2) (Figure 5) sont reconnues comme étant les plus puissants cancérigènes naturels. L'intoxication aiguë par les aflatoxines se traduit par des symptômes de dépression, anorexie, diarrhée, ictère ou d'anémie, pouvant aller jusqu'à la mort (Quillien, 2002).

Les aflatoxines apparaissent dans les noix (cacahuètes, noix du Brésil ...), les céréales, les poivres séchés et de nombreux autres aliments d'origine végétale. On trouve l'aflatoxine M dans le lait de vaches nourries de fourrage contaminé. Il s'agit en l'occurrence d'aflatoxine B métabolisée (4-hydroxylée) (Quillien, 2002).

2.3.5.2- L'ochratoxine A

La famille des ochratoxines comprend une dizaine de molécules connues, mais l'ochratoxine A est le représentant le plus important (Figure 6). Cette mycotoxine est produite par différentes espèces de *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. viridicatum*...) et d'*Aspergillus* (*A. ochraceus*...). En effet, la température optimale de production de l'OTA par l'*Aspergillus ochraceus* est de 28 °C, cette production étant fortement réduite à 15°C ou 37°C. Au contraire, *Penicillium viridicatum* se développe et peut produire de l'OTA dans une gamme de températures qui varie de 4 à 30°C. Dans les régions froides, l'OTA est donc plutôt produite par des *Penicillium*, alors que dans les régions chaudes, ce sont plutôt les *Aspergillus* qui la synthétisent (Pohland et al., 1992; Varga et al., 1996).

La toxicité de cette mycotoxine peut varier en fonction de l'espèce, du sexe, de la voie d'administration (Pohland et al., 1992 ; Marquardt et Fröhlich, 1992).

Chez l'homme, l'OTA est suspecte d'être impliquée dans la néphropathie endémique des Balkans. Elle est classée dans le groupe 2B des molécules cancérigènes chez l'animal est possiblement cancérigènes chez l'homme (Vainio et al., 1992; Vrabceva et al., 2000; Abouzied et al., 2002; Vrabceva et al., 2004).

2.3.5.3- Les fumonisines

Les fumonisines sont un groupe de mycotoxines caractérisées à la fin des années 80 et produites par *Fusarium verticilloides*, une moisissure présente dans le monde entier et fréquemment retrouvée sur le maïs. Plusieurs souches de *F. verticilloides* isolées d'autres substrats comme le sorgho et l'avoine produisent des quantités importantes de fumonisines (Sugita-Konishi et al., 2006 ; Ayalew et al., 2006).

Ces toxines peuvent aussi être produites par *F. proliferatum* et *F. nygamai* qui parasite principalement le sorgho et le millet (Nelson et al., 1992; Norred et al., 1992). On a aussi montré que les fumonisines peuvent être élaborées par *F. oxysporum* et *F. polyphialidicum* (Abbas et Ocamb, 1995) ; *A. alternata* sp. *Lycopersi* peut synthétiser aussi des fumonisines (Abbas et al., 1997).

Aujourd'hui la famille des fumonisines comprend 15 molécules différentes. Les fumonisines B1, B2 et B3 (Figure 7) sont les plus répandues dans le monde comme des contaminants naturels des céréales.

La toxicité des fumonisines est caractérisée par l'apparition de signes cliniques très différents en fonction des espèces (Osweiler et al., 1992 ; Ross et al, 1992 ; Colvin et al., 1993).

2.3.5.4- Les trichothécènes

C'est une famille composée d'environ 148 composés, tous produits par de nombreuses espèces fongiques dont celles des genres *Fusarium*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Trichoderma* et *Stachybotrys* (Figure 8). Les mycotoxines les plus étudiées dans ce groupe sont le déoxynivalénol (DON), les toxines T-2 et HT-2 (OMS, 1980).

La toxine DON est une vomitoxine qui contamine les céréales en particulier le blé, l'orge, le maïs, le seigle, l'avoine, et le riz. L'occurrence de la toxine DON est associée principalement avec *F. graminearum* et *F. culmorum*. La DON peut provoquer des effets adverses après administration. L'administration d'une dose aiguë est caractérisée par deux effets toxicologiques à savoir la perte de l'appétit et les vomissements (Bottalico, 1998 ; Creppy, 2002).

Les toxines T-2 et HT-2 sont deux toxines produites sur les céréales (blé, orge, maïs, riz, avoine...) et les produits à base de céréales. Elles sont produites par de nombreuses espèces de *Fusarium*. La toxine T-2 est un inhibiteur potentiel de la synthèse protéique. Alors que la toxine HT-2 a pour cible le système immunitaire (Bottalico, 1998).

2.3.5.5- La zéaralénone

La zéaralénone (ZEA) ou toxine F-2 est produite par les espèces appartenant au genre *Fusarium*, en particulier *F. graminearum*, *F. semitectum*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* et *F. culmorum*. Elle peut être également être synthétisée par *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichoïdes* et *F. laterium*. La production de cette mycotoxine est favorisée lorsque les températures sont situées entre 10 et 15°C (Abbas et al., 1988 ; Tabuc, 2007).

La ZEA est une lactone de l'acide résorcyclique sans toxicité intrinsèque mais de par sa similitude avec l'œstrogène (Figure 9), la ZEA est responsable de troubles de la reproduction et notamment du syndrome oestrogénique chez le porc. La principale moisissure responsable de la production de cette mycotoxine est *Fusarium graminearum* même si d'autres champignons sont capables de la produire. Sa répartition est mondiale, elle est présente dans l'ensilage, le foin, le maïs ou d'autres céréales (Whitlow et al., 2001).

2.3.6-Mycotoxines produites par *Penicillium chrysogenum*

Penicillium chrysogenum synthétise des mycotoxines de la famille des alcaloïdes et certaines mycotoxines du groupe des stérols comme le fungisterol (Figure 10) (Lugauskas, 2005 ; Sunesson et al., 1996 ; Lugauskas et al., 2005).

De plus, il produit des toxines comme la roquefortine C (Figure 11) sur d'autres substrats que la nourriture ainsi que l'acide cyclopiazonique (CPA) (Figure 12). Initialement, la roquefortine C a été isolée à partir de cultures de *Penicillium roquefortii* qui est industriellement employé pour la production des fromages bleus. Toutefois, dans les conditions normales de production des fromages, cette toxine n'est pas élaborée, mais elle peut se trouver sur d'autres substrats (Aninat et al., 2005).

2.3.7- Méthodes d'analyses des mycotoxines

Pour l'analyse des mycotoxines, habituellement présentes à l'état de traces, il existe une panoplie de méthodes analytiques basées essentiellement sur la séparation chromatographiques des molécules puis leur détection par spectrophotométrie ou fluorimétrie. Pour quantifier les mycotoxines présentes dans les aliments, elles sont d'abord extraites puis purifiées avant d'être détectées.

Certaines méthodes de détection comme la chromatographie couche mince (CCM) et des méthodes immunochimiques tel que l' « Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay » ou ELISA permettent une détection qualitative et semi-quantitative. Elles ont l'avantage d'être rapides et peuvent traiter plusieurs échantillons en parallèle. Les techniques immunochimiques reposent sur l'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé contre la mycotoxine recherchée. Ces méthodes peuvent créer des faux positifs qui entraînent une surestimation des résultats. Les limites de détection sont en général de moins de 1 ppb (Barna-Vetro et *al.*, 1994).

Les méthodes de référence à savoir la chromatographie gazeuse (CPG) pour les composés volatils et la chromatographie liquide haute performance (HPLC) permettent de quantifier de façon précise les mycotoxines.

La chromatographie gazeuse est réservée à l'étude de mycotoxines qui peuvent être volatilisées par dérivatisation comme les trichothécènes (Langseth et Rundberget, 1998).

La technique HPLC est la méthode la plus utilisée. Grâce au couplage avec la fluorimétrie, elle peut atteindre des limites de détection très faibles (de l'ordre de 10 ng/kg). Lorsqu'elle est combinée à une étape préalable de purification par chromatographie d'immunoaffinité, cette méthode est validée au niveau international et fait l'objet de normes (Takino et *al.*, 2004 ; Spanjer et *al.*, 2008 ; Monbaliu et *al.*, 2009).

La chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC/MS) est de plus en plus utilisée pour identifier les mycotoxines ou métabolites associés car elle permet une détection simultanée de plusieurs mycotoxines. La chromatographie gazeuse couplée à un détecteur de masse (GC/MS) peut elle aussi être utilisée pour détecter plusieurs mycotoxines simultanément (Tanaka et *al.*, 2000).

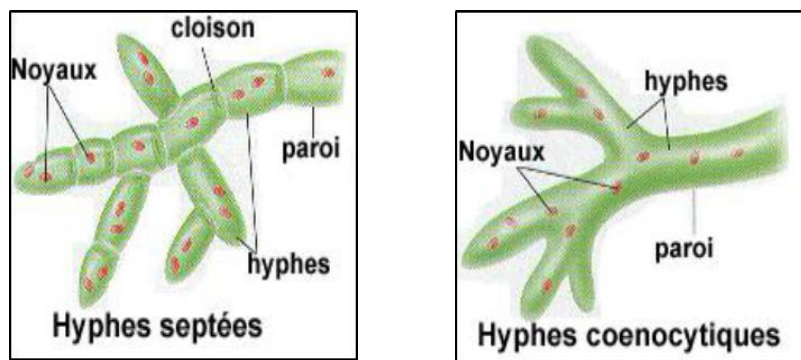


Figure 1 Représentation schématique de l'hyphe (Decocq, 2011).

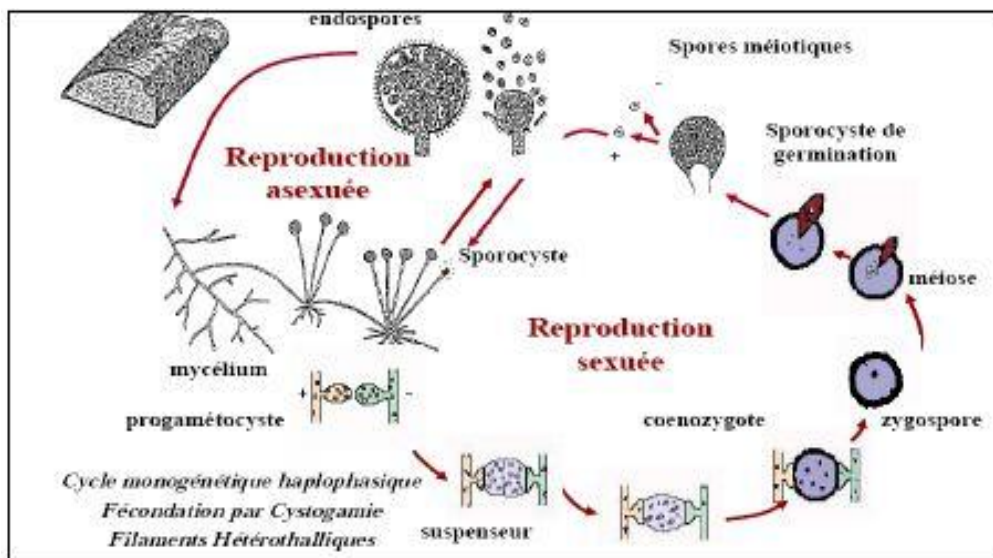


Figure 2 Cycle de vie des champignons (Roquebert, 2002).



Figure 3 Caractères macroscopique de *Penicillium chrysogenum*

(<http://mycota-crcm.mnhn.fr>).

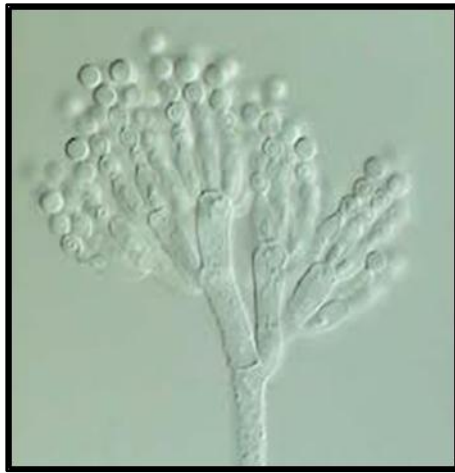


Figure 4 Caractères microscopique de *Penicillium chrysogenum*

(<http://mycota-crcc.mnhn.fr>).

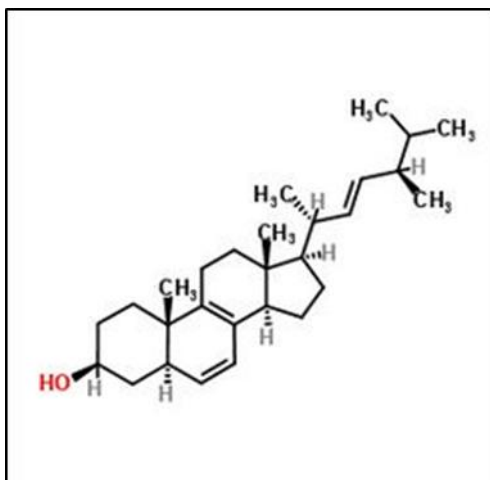


Figure 10 Structure de fungisterol (<http://www.chemspider.com>).

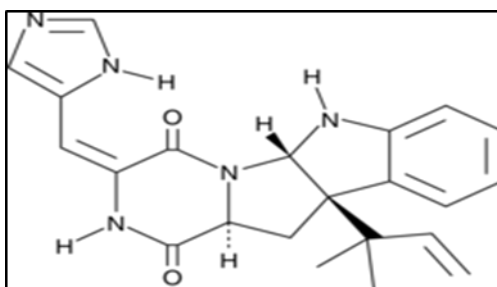


Figure 11 Structure de la roquefortine C (<https://www.caymanchem.com>).

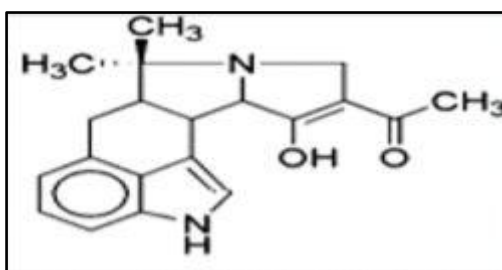


Figure 12 Structure chimique de l'acide cyclopiazonique.

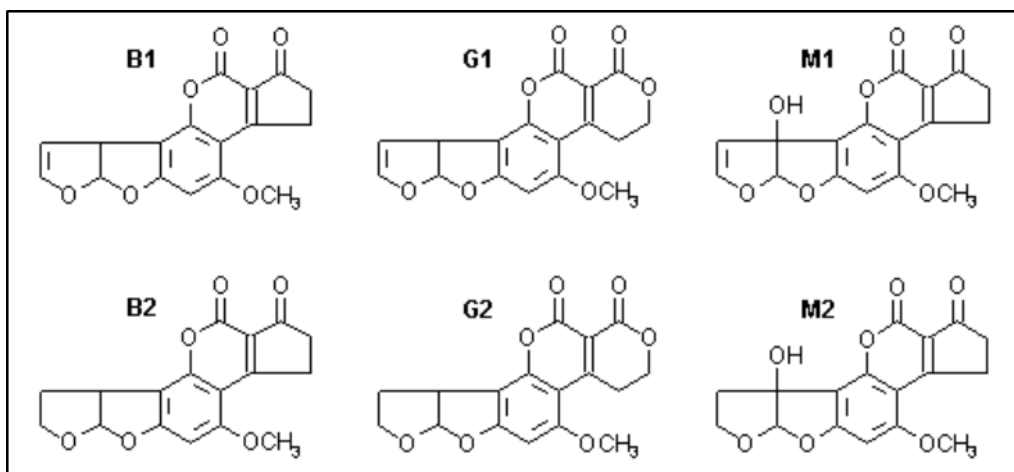


Figure 5 Structure chimique des aflatoxines (Quillien, 2002).

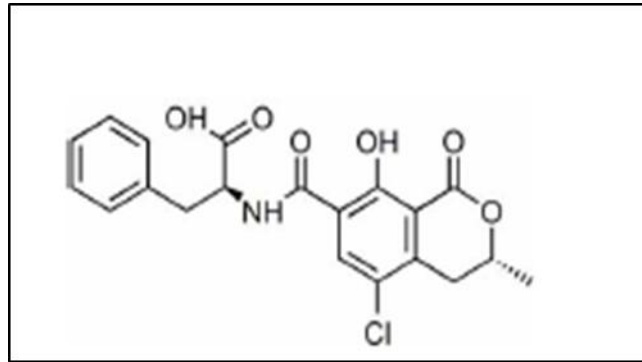


Figure 6 Structure chimique de l'ochratoxine A (Eskola, 2002).

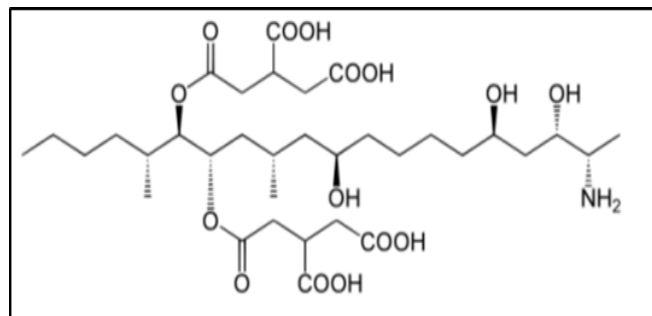


Figure 7 Structure générale des fumonisines (Thibault et *al.*, 1997).

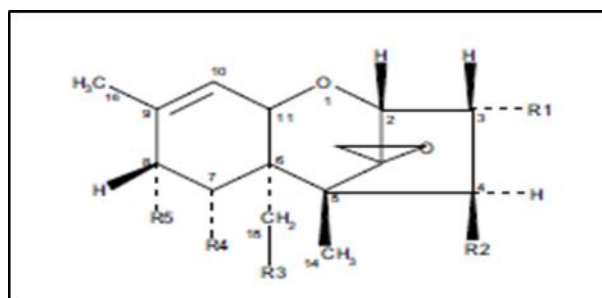


Figure 8 Structure générale semi développée des trichothecenes (IPCS, 1990).

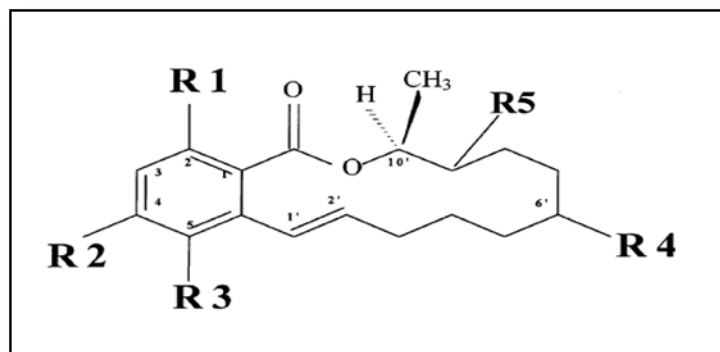


Figure 9 Structure chimique de la zéaralène (Willie et Morehouse, 1977).

Tableau 2 Exemples de mycotoxines produites par certaines moisissures (Halewyn et *al.*, 2001).

Genres	Espèces	Principales mycotoxines
<i>Alternaria</i>	<i>A.alternaria</i>	AltértoxineI, II, alternariol, altenuisol, acide tenuazoïque
<i>Aspergillus</i>	<i>A.flavus</i>	AflatoxineB1et B2, citrine
	<i>A.fumigatus</i>	Fumigaclavine, fumigatoxine, fumitremorfène, gliotoxine, acide helveolique, etc.
	<i>A.niger</i>	Acide oxalique
	<i>A.versicolor</i>	Aspercolorine, sterigmatocystine, versicolorine
<i>Chaetomium</i>	<i>C.spp</i>	Chaetomine
	<i>C.globosum</i>	Chasetoglobosine
<i>Cladosporium</i>	<i>C.spp</i>	Cladosporine, émodine, acide épycladosporique
<i>Fusarium</i>	<i>F.spp</i>	Trichotécènes (typeB), toxineT2, fumisinine, vomitoxine, zearalenone
<i>Memmoniella</i>	<i>M.spp</i>	Grisiofulvine, trichotécènes (trichodermol, trichodermine)
<i>Penicillium</i>	<i>P.brevicompactum</i>	BrevianamideA, acide mycophénolique
<i>Stachybotrys</i>	<i>S.chartarum</i>	Trichotécènes : satratoxineF, G, H, lacone, roridine, trichoverrine, sporidesmineG, verrucarineJ
<i>Trichoderma</i>	<i>T.viride</i>	Trichodermine, trichoverine, satratoxine, gliotoxine, fumitremogène, iso-cyanide, toxineT-2

Tableau 3 Mycotoxines produites par certains champignons (Ciegler et Kurtzman, 1970 ; Le Bars et Le bars, 1987 ; Comerio *et al.*, 1998).

Mycotoxines	Moisissures	Conditions favorables	Denrée
Aflatoxine B1, B2, G1 et G2	<i>A. parasiticus</i> , <i>A. flavus</i>	Climats tropicaux et Subtropicaux	Arachide, maïs, Sorgho
Ochratoxines A, B, C	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. nordicum</i>	Climats frais et tempérés	Maïs, orge, blé, café Raisin, vin
Zéaralénone	<i>Fusariumroseum</i> , <i>Fusariumsp.</i>	Moisissures ubiquistes	Maïs, blé, sorgho
Vomitoxine, Nivalenol, Fusarenone, ToxineT2, Diacetoxyscirpenol	<i>F. tricinctum</i> , <i>Fusariumsp.</i>	Moisissures ubiquistes	Maïs, orge, blé, Avoine
Fumonisine	<i>F. moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>Fusarium sp.</i>	Climates tempérés et climats chauds	Maïs, orge, blé, Avoine
Citrinine	<i>P. citrinum</i> , <i>Monascusruber</i>	Climats tempérés	Fruits, riz, maïs
Patuline	<i>P. patulum</i> , <i>Byssochlamysnivea</i>	Traumatisme, défaut d'aérobiose	Pomme, maïs
Acide penicillique	<i>A. ochraceus</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. puberulum</i>	Climats frais	Maïs
Moniliformine	<i>F. proliferatum</i> , <i>F. subglutinans</i>	Moisissures ubiquistes	Maïs
Acide cyclopiazonique	<i>A. flavus</i>	Souvent en association aux Aflatoxines	Maïs

Matériel et Méthodes

3- Matériel et Méthodes

Le présent travail porte sur l'extraction et l'identification de mycotoxines de *Penicillium chrysogenum*. Ce travail a été initié et réalisé dans le laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Frères Mentouri Constantine.

3.1- Prélèvement de l'échantillon

Des fruits d'oranges sont introduits dans un sac en plastique stérile pour une durée de 15 jours à température ambiante (20°C) pour obtenir des fruits contaminés (Figure 13).



Figure13 Fruits d'oranges contaminés.

3.2-Isolement de *Penicillium chrysogenum*

Une aliquote de la peau des fruits d'oranges contaminés est prélevée à l'aide d'une anse de platine stérile, puis transférée sur milieu solide Sabouraud, CEA (Annexe 1), par la méthode de touche centrale. Les boites de pétri sont incubées à 30°C pendant 4-6 jours.

3.3-Purification de la souche

La purification des souches est effectuée par le repiquage au centre de boîte contenant le même milieu et dans les mêmes conditions d'incubation jusqu'à l'obtention de souches pures (Guiraud, 2003).

3.4- Identification de la souche

L'identification des moisissures basées sur les caractères cultureux (observation macroscopique) et l'observation microscopiques ainsi que des propriétés biochimiques (Botton et *al.*, 1990).

3.4.1-Identification macroscopique

L'observation macroscopique est réalisée sur la face et le revers de la boîte, en basant sur la détermination de l'aspect des colonies et la forme et la couleur des spores et la vitesse de croissance et le diamètre de la colonie (Botton et *al.*, 1990).

3.4.2- Identification microscopique

L'identification microscopique des champignons repose sur plusieurs méthodes, les méthodes les plus utilisées sont celles du ruban adhésif, méthode de lactophénol (Annexe 2) et de l'état frais.

3.4.2.1- Méthode de Ruban adhésif

Un petit morceau du ruban adhésif est appliqué par la face collante sur la colonie puis déposé sur une lame porte-objet. Puis observation au microscope à immersion à l'objectif ($\times 40$) puis à ($\times 100$) (Joffin, 2013)

3.4.2.2- Méthode de lactophénol bleu de coton

Un fragment de la colonie est prélevé à l'aide d'une anse de platine et déposé sur une lame porte-objet dans une goutte de colorant ensuite recouvrir avec une lamelle couvre-objet qui fait écrasée la préparation (Chabasse et *al.*, 2002).

3.4.2.3-Examen microscopique à l'état frais

Cette méthode consiste à déposer une goutte d'eau distillée sur la lame, puis apporter et dissocier dans la goutte un prélèvement de la colonie à identifier, recouvrir la lame par une lamelle puis observer au microscope à immersion à l'objectif ($\times 40$) puis ($\times 100$) (Carip, 2008).

L'observation au microscope à immersion a été effectuée aux différents grossissements ($\times 10$, $\times 40$), et puis ($\times 100$).

Ce type d'identification est fondée essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation,...) et des spores (forme, couleur, texture des parois,...) (Harrigan et McCance, 1976 ; Oteng-Gyang, 1984 ; Guiraud, 1998).

3.5- Mise en culture de *Penicillium chrysogenum* et extraction de mycotoxines

3.5.1- Mise en culture de *Penicillium chrysogenum* sur milieu solide

Environ 1ml de la suspension sporale de *Penicillium chrysogenum* est étalé par inondation sur milieu Sabouraud en boîtes de pétri stériles, qui sont ensuite incubées à l'étuve à 30°C pendant 5-7 jours. La présence de mycotoxines est détectée par fluorescence UV à 365 nm car elles développent autour de la colonie *Penicillium chrysogenum* une fluorescence bleu sur milieu Sabouraud.

3.5.2- Extraction de mycotoxines

La partie de la gélose qui développe une fluorescence bleu signifiant la présence des mycotoxines est découpée à l'aide d'un emporte pièces sous forme de disques ayant 5-6 mm de diamètre. Les disques sont ensuite placés dans des tubes à essais contenant environ 15ml de méthanol, puis conservé pendant 2-10 jours à 4°C pour éviter la dénaturation des molécules organiques.

3.6- Test d'antibièse

Afin d'étudier l'effet inhibiteur des mycotoxines sur la bactérie test *Escherichia coli*, 1ml de la suspension bactérienne d'*E. coli* est étalé dans des boîtes de pétri stériles contenant le milieu gélosé Muller- Hinton (MH) (Annexe 4) ensuite des disques de 5-

6 mm sont prélevés à l'aide d'un emporte pièces en formant des puits, les puits sont remplis par un volume de 1ml de l'échantillon. La mesure des zones d'inhibition autour des puits est effectuée après 17-24 heures d'inhibition à 30°C (Tortorano et *al.*, 1979).

3.7- Identification de mycotoxines

3.7.1- Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince constitue la méthode de base qui permet une séparation efficace des mycotoxines et leur identification avec une bonne précision. Elle se fait sur une plaque de silicegel sur laquelle est déposé un spot de 10µl de l'échantillon (Figure 14). La plaque est ensuite placée dans une cuve chromatographique et trempée dans un mélange de solvant d'éluant constitué de :

- Butanol, acide acétique et l'eau de volume (1/1/ 1).
- Chloroforme et méthanol de volume (90 /10).

Après migration et évaporation du produit d'éluant, la plaque est examinée sous une lampe à UV à une longueur d'onde de 365 nm. La présence des mycotoxines se traduit par une fluorescence et un RF (facteur de rétention).

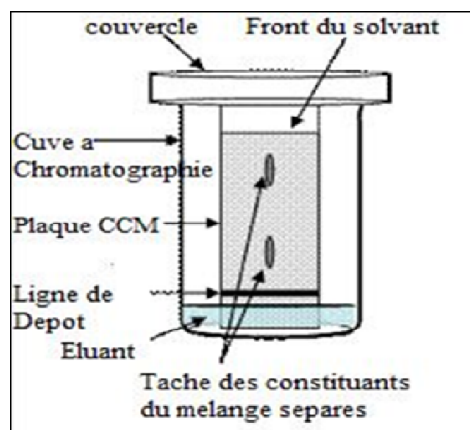


Figure 14 Schéma représente la chromatographie sur Couche Mince(www.google.fr).

3.7.2- Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

La Chromatographie en Phase Liquide Haute Performance ou HPLC est une technique analytique qui permet la séparation d'un ou de plusieurs composés,

contenus dans un mélange, en vue de leur caractérisation et de leur quantification : le système permettant d'effectuer cette séparation est appelé système de phases et est composé de la phase stationnaire et de la phase mobile. La méthode de chromatographie HPLC utilisée pour la séparation et la caractérisation des mycotoxines est la chromatographie d'adsorption en phase inverse.

Le système HPLC utilisé (JASCO) équipé d'une boucle d'injecteur de 20 μ l, d'un détecteur fluorimétrie. La colonne utilisée est une colonne C18 (ODS 5 μ m. 25 \times 0.46cm) en phase inverse. La phase mobile est composée de l'acétonitrile / l'eau (10/10 : v/v). Le débit de la phase mobile est réglé à 2ml /min. L'excitation est faite à 254 nm. Couplé d'un ordinateur mené d'un logiciel (Marcos et *al.*, 2013).

*Résultats et
Discussion*

4- Résultats et Discussion

Le présent travail porte sur l'extraction et l'identification de mycotoxines de *Penicillium chrysogenum*.

4.1- Isolement et purification de l'isolat fongique

L'isolement des moisissures doit passer par l'élimination des autres microorganismes. Cependant, le prélèvement réalisé à l'aide d'une anse de platine d'un petit fragment d'échantillon et l'ensemencement sur des milieux solides en l'occurrence : Sabouraud, CEA, ont permis l'isolement d'un seul isolat fongique sur milieu Sabouraud (Figure 15), alors que dans le milieu CEA on n'a pas eu de croissance.



Figure 15 *Penicillium chrysogenum* isolé sur milieu Sabouraud.

Le milieu Sabouraud est un milieu favorable à la croissance des champignons microscopiques grâce à son pH relativement acide et à sa composition chimique (protéines, sucres et oligoéléments) et sa transparence qui permet d'obtenir des résultats clairs et visibles et même de contrôler la pureté de la souche.

4.2- Identification de la souche

4.2.1- Identification macroscopique

Les caractères macroscopiques de l'isolat fongique obtenu sont étudiés sur milieu Sabouraud, l'un des milieux les plus fréquemment utilisés (Botton et *al.*, 1990). Le tableau 4 résume l'aspect macroscopique des mycéliums, la texture, la couleur du mycélium et du contour et la

couleur du revers des boites. Par ailleurs, la figure 16 illustre la morphologie de l'isolat fongique obtenu.

L'isolat fongique se développe rapidement sous forme de colonies bleu vert, circulaire, avec un contour blanc, et généralement avec une production de gouttelettes d'exsudat jaune, cette espèce est en plus capable de se développer à 37°C et avec une faible activité en eau (a_w minimale = 0,78 - 0,8) (Pitt, 1979).

La colonie de l'isolat fongique atteint 17 mm de diamètre en 4 jours d'incubation sur milieu Sabouraud et 47 mm de diamètre en 9 jours.

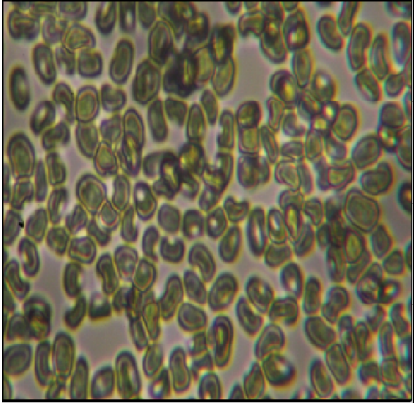
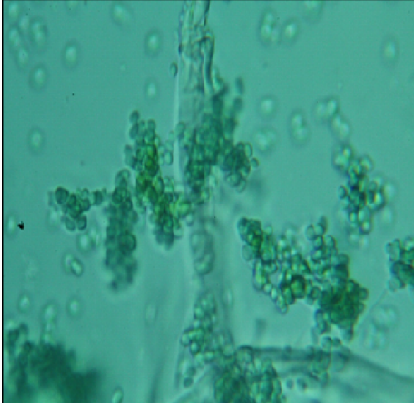
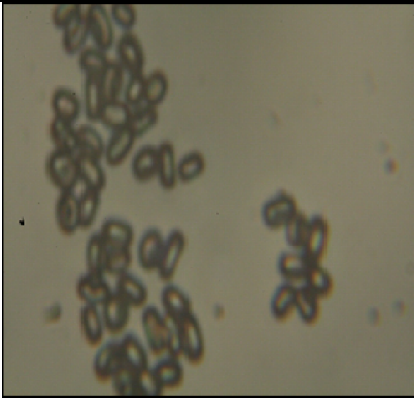
4.2.2- Identification microscopique

L'étude microscopique porte sur l'observation des structures caractéristiques de la souche fongique étudiée (Conidiophores, conidies, mycélium...). Le tableau 5 résume ces caractères. D'après la technique de ruban adhésif on a pu observer des spores dispersées ou assemblées de couleur vert.

La technique de coloration de lactophénol bleu à permet d'observer des conidiophores isolés, des pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité des conidiophores qui apparaissent tous colorés en bleu.

L'observation microscopique à l'état frais mis en évidence des cellules sporales transparentes unitaires ou groupées à paroi épaisse.

Tableau 5 Caractères microscopiques de la souche *Penicillium chrysogenum*.

Techniques	Aspect microscopique (G×40)	Caractères microscopiques
Ruban adhésif		-Spores.
Lactophénol bleu de coton		-Conidiophores isolés -Pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore.
Etat frais		-Spores

Ces observations correspondant au genre *Penicillium* et l'espèce *Penicillium chrysogenum*, suivant (Botton et *al.*, 1990).

4.3- Mise en culture de *Penicillium chrysogenum* et extraction de mycotoxines

Le *Penicillium chrysogenum* se développe considérablement sur milieu Sabouraud qui présente des caractéristiques physicochimiques importantes telles que sa richesse en composés organiques nécessaires pour la croissance de la moisissure *P. chrysogenum*, et grâce à sa transparence, il facilite l'observation des changements minimes dans le milieu (coloration) et facilite l'observation des colonies. La lecture par une lampe UV des boîtes contenant le milieu Sabouraud, conduit à l'observation des mycotoxines qui apparaissent à l'UV à 365nm de couleur bleue (Figure 17).

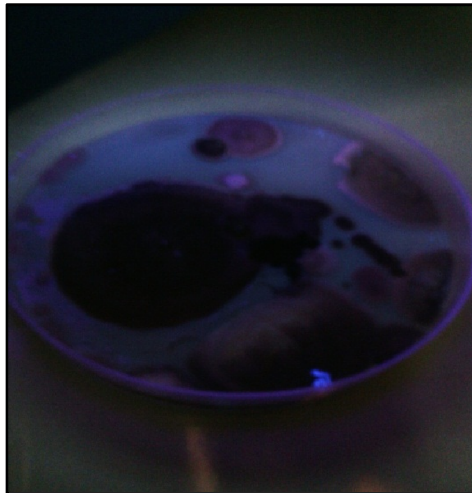


Figure 17 Observation sous UV à 365nm des boîtes de *Penicillium chrysogenum* productrices des mycotoxines.

4.4- Test d'antibiose

Le tableau 6 révèle que les mycotoxines de *Penicillium chrysogenum* testées sur *Escherichia coli*, ensemencée sur milieu Muller-Hinton ont exercées une activité inhibitrice importante. Les diamètres d'inhibition varient entre 10 mm à 20 mm.

Tableau 6 L'effet des mycotoxines sur la bactérie *Escherichia coli*.

<i>E.coli</i>	Répétition1	Répétition 2	Répétition 3	Répétition 4
Diamètres (mm)	19 - 20	12- 14	12 – 16	10 - 14

Les diamètres d'inhibition obtenus sont tous supérieurs à 10 mm, Selon Pereira, (2006), Seokwon, (2006), nos résultats sont significatifs.

4.5-Identification des mycotoxines

4.5.1- Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

La Chromatographie sur Couche Mince de la mycotoxine de *P. chrysogenum* selon l'étude de Vinokurova et *al.*, en (2001), utilisant le mélange de solvants : chloroforme/méthanol (90/10) volume par volume, entraîne une migration suffisante des molécules avec un $R_f=0.54$, la tâche prend une coloration violette après révélation chimique par le réactif de Ehrlich, cette coloration indique la présence de la roquefortine. Cette coloration est due à la formation d'un complexe chromophore entre deux molécules indoles et la fonction aldéhyde donnant ainsi une coloration jaunâtre puis vert grisâtre (violette).

Le système de séparation formé de : Butanol/Acide acétique/Eau (1/1/1) volume par volume est le plus performant, et permet de déplacer les molécules à une distance d'environ 3.5 cm de front de solvant. La révélation de la plaque (CCM) sous UV à 365nm permis d'observer une tache correspondant à la production des mycotoxines par la souche de *P. chrysogenum*, ce résultat est confirmé par une 2^{ème} révélation à la ninhydrine (Figure 18), permettant d'observer une tache de couleur orange à violette, ce qui indique la présence d'un composé organique porteur de fonctions (N-H) dans leur structure à savoir la mycotoxine qui est un alcaloïde, et qui possède un rapport frontal $R_f=0.83$ (Annexe 3).



Figure 18 La plaque (CCM) après révélation sous UV et après révélation à la ninhydrine.

4.5.2-Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

Le chromatogramme issu de l' HPLC des mycotoxines de *P. chrysogenum* montre la détection de plusieurs pics distinctes correspondantes selon leur temps de parution à la roquefortine N pic (12), apparaissant à 15.1 min, la roquefortine C pic (11) à 16.5 min, la roquefortine L pic (6) à 16.8 min, et roquefortine F pic (9) à 22.8 min. tandis que le standard (la neoxaline) pic (10) à 17.8 min. (Marco et *al.*, 2013).

Nos profile HPLC montre la détection de trois pics distinctes dont uniquement celle apparus à environ 15 min correspond à une molécule de roquefortine C. Les deux pics restants correspondent donc à d'autres molécules.

Ces résultats confirment la présence de plusieurs molécules de mycotoxines y compris la roquefortine C, produites par la souche fongique *Penicillium chrysogenum* tels qu'il est démontré par les chromatogrammes.

Tableau 4 Caractères morphologiques de la souche *Penicillium chrysogenum*.

La souche	Couleur du mycélium et du contour	Forme du mycélium	Texture	Couleur du revers	Diamètre de la colonie
<i>P.chrysogenum</i>	Vert foncé à blanc irrégulier	Circulaire à développement lent	Velouté et poudreuse	Incolore	17-47mm



Figure 16 Aspect macroscopique de la souche *Penicillium chrysogenum* sur milieu Sabouraud.

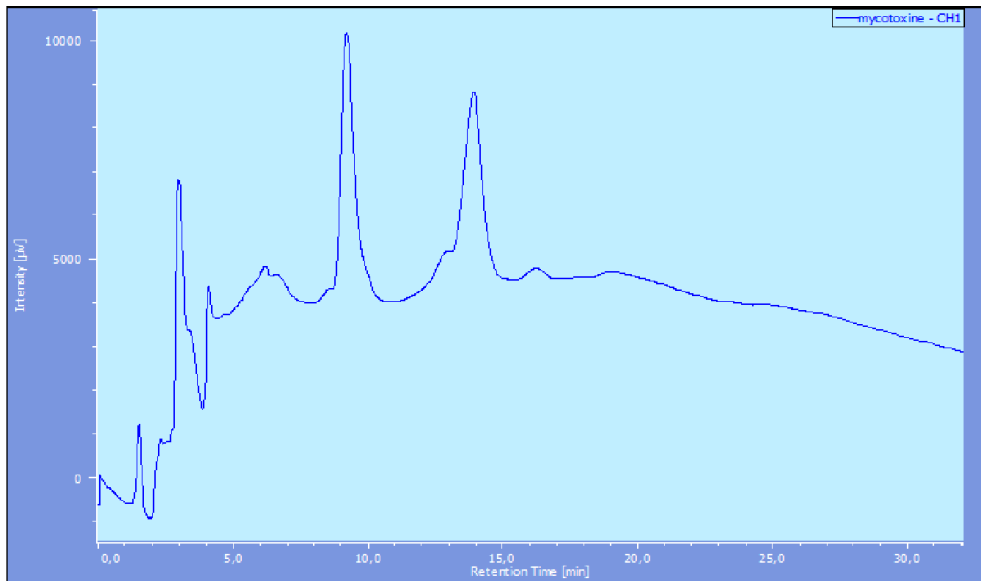


Figure 19 Nos Profile HPLC des mycotoxines de *Penicillium chrysogenum*.

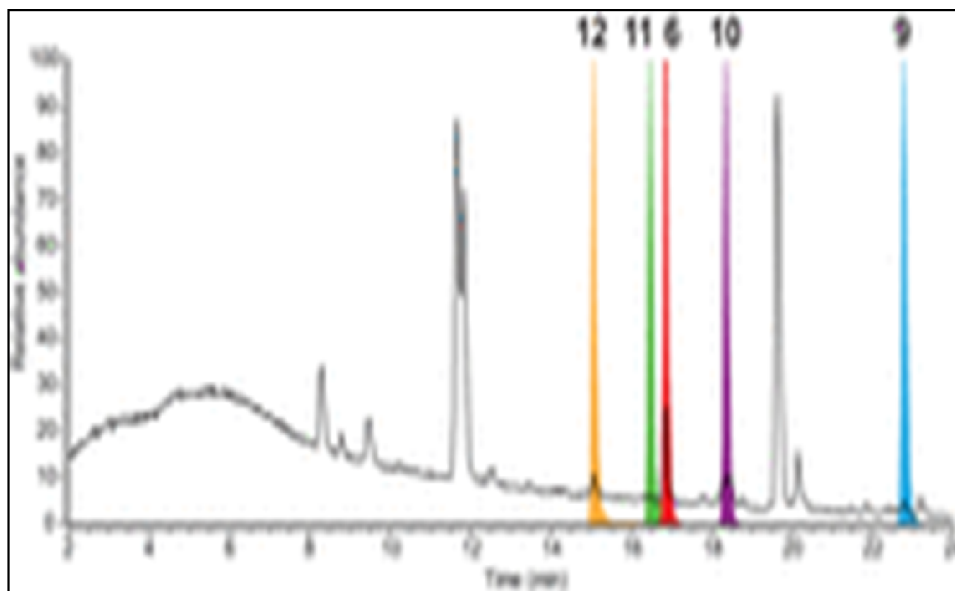


Figure 20 Profile HPLC des mycotoxines de *Penicillium chrysogenum*.

(Marco et al., 2013).

Conclusion

5- Conclusion

Dans le cadre de la recherche des mycotoxines élaborées par *Penicillium chrysogenum*, un prélèvement a été effectué à partir des fruits d'orange contaminés sur milieu Sabouraud.

L'identification préliminaire de l'isolat obtenu basé sur l'étude macroscopique et microscopique, a révélé qu'il s'agit de *Penicillium chrysogenum* se développe rapidement sous forme de filament septes de couleur vert bleuté.

L'effet inhibiteur des mycotoxines de *Penicillium chrysogenum* testés sur la bactérie *Escherichia coli* par la méthode des puits sur le milieu Muller-Hinton, exerce une activité inhibitrice importante.

La recherche des mycotoxines est effectuée par la technique de la chromatographie sur couche mince (CCM) qui permet d'observer une tâche de couleur orange à violette après la révélation sous UV et la ninhydrine. Ces résultats sont confirmés par la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) qui montre la détection d'un seul pic correspondant à une molécule de roquefortine C.

Résumé

6- Résumé

Les moisissures sont des contaminants fréquents de nombreux substrats végétaux et de certains produits d'origine animale. Leur présence peut améliorer les qualités organoleptiques du produit ou, au contraire, l'altérer et conduire à l'accumulation de métabolites secondaires toxiques : les mycotoxines.

L'objectif de ce travail a été de caractériser les mycotoxines produites par *P. chrysogenum* après identification de la souche sur milieux solides CEA et Sabouraud. Pour cela les mycotoxines secrétées sont extraites sous forme de disques de gélose et prélevés à l'aide d'un emporte-pièce, puis dissoutes dans le méthanol. Le test d'antibiose est réalisé par la méthode des puits dans des boîtes de pétri contenant le milieu Muller-Hinton ensemencé par *Escherichia coli*. L'extrait préparé précédemment a subi une chromatographie sur couche mince CCM Système : Butanol/Acide acétique/Eau (1/1/1) V/V/V et HPLC utilisant le mélange acétonitrile/eau (10/10) V/V comme phase mobile.

Les résultats ont montré une croissance importante de *P. chrysogenum* dans le milieu Sabouraud et les molécules de mycotoxines secrétées sont détectées dans les boîtes sous une lampe UV à 365nm en donnant une coloration bleutée. Le test d'antibiose a donné un résultat significatif sur la souche d'*Escherichia coli* avec des diamètres dépassant 17mm. La CCM a montré l'apparition d'une tache orange à violette ayant un $R_f=0.83$, tandis que l'HPLC a mis en évidence la roquefortine C à environ 15 min, Ces résultats ont mis en évidence la roquefortine C. utilisé dans l'industrie fromagère, et qui est en plus doté de propriétés antibactérienne.

Mots clés :

P. chrysogenum; Roquefortine C; Mycotoxines; CCM; HPLC; Test d'antibiose.

7-Abstract

Molds are common contaminants of many plant substrates and of certain products of animal origin. Their presence can improve the organoleptic qualities of the product or, on the contrary, to alter it and lead to the accumulation of toxic secondary metabolites: mycotoxins.

The objective of this work was to characterize the mycotoxins produced by *P. chrysogenum* after identification of the strain on solid media CEA and Sabouraud. This secreted mycotoxins are extracted in the form of discs of agar and collected using a cookie cutter. The antibiosis test is carried out by the method of the wells in a box of Petri dishes containing the Müller-Hinton medium inoculated by *Escherichia coli*. then dissolved in methanol extract prepared at undergoes a CCM system: Butanol/acetic acid / water (1/1/1) V/V/V and HPLC using the mixture of acetonitrile / water (10/10) V/V as the mobile phase.

The results showed a significant growth of *P. chrysogenum* in Sabouraud medium and the secreted molecules of mycotoxins are detected in the boxes under UV 365nm light giving a bluish coloration. The test of antibiosis gave a significant result on the strain of *Escherichia coli* with diameters exceeding 17 mm. The CCM to show the appearance of a purple orange a spot with an $RF = 0.83$, while HPLC has highlighted roquefortine C about 15 minutes. These results highlighted roquefortine C, used in the cheese industry, and who in addition has antibacterial properties.

Key words:

P. chrysogenum; Roquefortine C; Mycotoxins; CCM; HPLC; Test of antibiosis.

8-ملخص

تعتبر الفطريات من الملوثات الشائعة للعديد من النباتات وبعض المنتجات ذات المنشأ الحيواني. وجودهم يحسن نوعية المنتج، أو على العكس يؤدي إلى تراكم نواتج الأيض الثانوية السامة (السموم الفطرية).

وكان الهدف من هذا العمل التعرف على خصائص السموم الفطرية التي ينتجها *P. chrysogenum* بعد تحديده في اوساط صلبة CEA وSabouraud. هذه السموم الفطرية المفروزة يتم استخراجها في شكل أقراص و حلها في الميثانول، تخضع العينة لتقنية CCM بنظام الفصل حمض الخليك/بيوتانول/الماء (1/1/1) ح/ح/ح وتقنية HPLC باستخدام خليط الاسيتونيتريل/الماء (10/10) ح/ح . وإجراء اختبار المضاد الحيوى على نوع من البكتيريا *E.coli* الأسلوب في أطباق بترية تحتوي على وسط Muller Hinton.

وأظهرت النتائج حدوث نمو كبير ل *P.chrysogenum* في الوسط Sabouraud ويتم الكشف عن الجزيئات السمية الفطرية المفروزة في المربعات الموجودة أسفل مصباح الأشعة فوق البنفسجية (365 نانومتر) باعطاء لون ازرق. اما اختبار المضاد الحيوي اعطى نتيجة هامة مع البكتيريا بأقطار تتجاوز 17 ملم.

تظهر تقنية CCM بقعة أرجوانية حيث $RF = 0.83$ بينما HPLC تظهر في الدقيقة 15 دقيقة وجود C requefortine تبرز هذه النتائج C requefortine المستخدم في صناعة الجبن، بالإضافة إلى ذلك خصائص مضادة للجراثيم.

الكلمات المفتاحية

C requefortine , *P.chrysogenum* , HPLC, CCM, السموم الفطرية, اختبار المضاد الحيوى.

*Références
bibliographiques*

9- Références bibliographiques

Abbas, H.K., Mirocha, R.A., Meronuck, J.D., Pokorny, S.L. et Kommedahl, T. (1988). Mycotoxins and *Fusarium* spp. associated with infected ears of corn in Minnesota. *Appl and Environ Microbiol*, 54, p. 1930-1933.

Abbas, H.K., Ocamb, C.M., (1995). First report of production of fumonisin B1 by *Fusarium polyphialidum* collected from seeds of *Pinus strobes*. *Plant Dis.*, 79, p. 642-645

Abbas, H.K., Smeda, R.J., Duke, S.O., Shier, W.T., (1997). Fumonisin-Plant interactions, *Bulletins of the Institute for Comprehensive Agricultural Sciences*, Kinki University, 5, p. 63-73.

Abouzied, M.M., Horvath, A.D., Podlesny, P.M., Regina, N.P., Metodiev, V.D., Kamenova-Tozeva, R.M., Niagolova, N.D., Stein, A.D., Petropoulos, E.A., Ganev, V.S., (2002). Ochratoxin A concentrations in food and feed from a region with Balkan Endemic Nephropathy, *Food Addit Contam*, 19 (8), p. 755-764.

Aninat, C., Andre, F., Delaforge, M. (2005). Oxidative metabolism by P450 and function coupling to efflux systems: modulation of mycotoxin toxicity. *Food Addit. Contam.* 22[4], p. 361-368.

Ayalew, A., Fehrmann, H., Lepschy, J., Beck, R., Abate, D., (2006), Natural occurrence of mycotoxins in staple cereals from Ethiopia, *Mycopathologia*, 162 (1), p. 57-63.

Barna-Vetro, I., Gyongyosi, A., Solti, L. (1994). Monoclonal antibody-based Enzymelinked immunosorbent assay of *Fusarium* T-2 and zearalenone toxins in cereals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, p. 729-731.

Blackwell, M. (2011). "The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?" *American Journal of Botany* 98(3), p. 426-438.

Boiron, P. (1996). Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. P. 19-79.

Bottalico, A. (1998) *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles in Europe. *J Plant Pathol*, 80 (2), p. 85-103.

Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y. et Veau, P. (1999). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris. p. 12-426.

Botton, B., Bretton, A., Fever, M., Gautier, S., Guy, Ph., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J-J., Vayssier, Y. et Veau, P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, (edn) Masson, Paris.

Bourgeois, C.M., Mescle J.F. et Jucca, J. (1996). Microbiologie alimentaire, Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier Tech et Doc. France.

Bourgeois, C.M., Mescle, J.F., Zucca, J. (1989). Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. p. 216-244.

Bradburn, N., Coker, R.D. et Blunden, G., (1994). The Aetiology of Turkey X Disease. *Phytochemistry*, 35 (3), p. 817.

Bringmann, G., Lang, G., Gulder, T.A.M., Tsurta, H., Muhlbacher, J., Maksimenka, K., Steffens, S., Schaumann, K., Stor, R., Wiese, J., Imhoff J.F., Perovic-Ottstadt, S., Boreiko, O. et Muller, W.E.G. (2005). The first sorbicillinoid alkaloids, the antileukemic sorbicillactones A and B, from a sponge-derived *Penicillium chrysogenum* strain Tetrahedron, 61, p. 7252-7265.

Brochard, G., Le Bâcle, C. (2009). Les mycotoxines en milieu de travail. Documents pour le Médecin du travail N°119. INRS.

Cahagnier, B., Dragacci S., Frayssinet, C., Frémy, J. M., Hennebert, G. L., Lesage-meessen, L., Multon, J. L., Richard-Molard, D. et Roquebert, M. F. (1998). Moisissures des aliments peu hydratés. Lavoisier Tec&Doc. France. p. 225.

Cairns, V., Hope, R., Magan, N. (2003). Environmental factors and competing mycoflora affect growth and ochratoxin production by *Penicillium verrucosum* on wheat grain. *Aspects of Applied Biology*, 68, p.81-90.

Cardinal, L. (2003). Programme national de santé publique 2003-2012 (PNSP). Massé, R and Gilbert, L. msss.qc.ca. Québec, Direction générale de la santé publique, Ministère de la Santé et des Services sociaux.

Carip, C. (2008). *Microbiologie*. Hygiene Medicales internationales. Mic/015, p.9.10.19.

Carlile, M. J., Watkinson, S. C. et Gooday, G. (1994). *The fungi*, Springer.

Cast (Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA). (2003). Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems, Task force report No. 139 .

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

Christensen, C.M. (1974). Storage of cereal grains and their products, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA.

Ciegler, A., et Kurtzman, C. P. (1970). Penicillic acid production by blue-eye fungi on various agriculture commodities. *Appl. Microbiol.* 20 (5):p.761-764.

Colvin, B.M., Cooley, M., Beaver, R.W., (1993). Fumonisin intoxicosis in swine: clinical and pathologic findings, *J. Vet. Diagn. Invest*, 5, p. 232-241.

Comerio, R., Pinto V. E. F. et Vaamonde, G. (1998). Influence of water activity on *Penicillium citrinum* growth and kinetics of citrinin accumulation in wheat. *Inter. J. of Food Microbiol.* 42, p.219-223.

Creppy, EE. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett*, 127 , p. 19-28.

Decocq, G. (2011). Le monde fongique. L'homme et son environnement UE 7. «Santé, Société, Humanité». p.1-20.

D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C.(1997).Mycotoxins.*Animal Feed ScienceTechnology*, 69, p. 155-166.

Davet, P. (1996). *Vie microbienne du sol et production végétales*, (edn) INRA.Paris.

Delgado-Jarana J., Rincon A. M. et Benitez T. (2002). Aspartyl protease from *Trichoderma reesei* CECT 2413: cloning and characterization. *Microbiology*. 148,p.1305-1315.

De Moura Sarquis, M.I. et De Oliveira, P.C., (1996).Diversity of microfungi in the sandy soil of Ipanema Beach, Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Basic Microbiology*, 36,p. 51-58.

Ellis, D. (2007). Mycology online. University of Adelaide. School of molecular & biomedical science. The University of Adelaide.

Eskola, M. (2002). Study on trichothecenes, Zearalenone and Ochratoxin A in Finnish Cereals: Occurrence and Analytical Techniques. Academic dissertation.

Etzel, R.A. (2002). Mycotoxins. *JAMA*. 297 (4), p.425 – 427.

[38] **Ferguson, B., Dreisbach, T., Parks, C., Filip, G. et Schmitt, C.** (2003). "Coarse-scale population structure of pathogenic *Armillaria* species in a mixed-conifer forest in the Blue Mountains of northeast Oregon." *Canadian Journal of Forest Research* 33(4),p.612-623.

Fitzgerald., J.M., Collin, R.G., et Towers, N.R. (1998). Biological control of sporidesmin-producing strains of *Pithomyces chartarum* by biocompetitive exclusion. *Lett. Appl. Microbiol*, 26(1), p. 17-21.

Florent, J. (1993).Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêts industriels. Ed. Lavoisier Tec et Doc, p. 612.

Glass, N. L., Rasmussen, C. M., Roca, G. et Read, N. D. (2004). "Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness." *Trends Microbiol* 12 (3), p. 135-141.

Golinski, P., Kostecki, M., Lasocka, I., Wisniewska, H., Chelkowski, J., Kaczmarek, Z.(1996).Moniliformin accumulation and other effects of

Fusariumavenaceum(Fr.) Sacc. Onkernels of winter wheat cultivars. *Journal of Phytopathology*, 144, p. 495-499.

Grigoriev, I. V., D. Cullen, S. B. Goodwin, D. Hibbett, T. W. Jeffries, C. P. Kubicek, C. Kuske, J. K. Magnuson, F. Martin et J. W. Spatafora (2011). "Fueling the future with fungal genomics." *Mycology* 2(3), p. 192-209.

Guiraud, J. P. (1998). Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris, p. 7-330.

Guiraud, J.P. (2003). Microbiologie alimentaires. (edn) Dunod. Paris, p. 651.

Gund-Cameran, N., Cerovac, S. etZalar, P.(2001). Biodiversity of filamentous fungi in the salt pans secovlje. *ActaBiologicaSlovenica*, 44, p. 25-30.

Gund-Cimerman, N., Bunter, L., Sonjak, S., Turk, M., Ursic, V., Zalar, P. etPlemenitas, A.(2005). Halotolerant and halophilic fungi from coastal environments in the arctics. Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya, Gunde-Cimerman, N. (Ed) Springer, p.397-423.

Halewyn. M.A., Lercterc J.M., King N., Belonger M., Legris M. etFrenett Y. (2001). Les risques à la santé associés à la présence de moisissure en milieu interieur, (edn) ISBN.Quebec.Canada.

Harrigan, W; McCance, M. (1976).Laboratory methods in food and dairy microbiology.

Hawksworth,D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C. et Pegler, D.N. (1994). Ainsworth andBysby's dictionary of the fungi, 8 th ed. International Mycological Institute, Egham.Unitted .Kingdom.

Hendey, K.H. et Cole, C.E. (1993).Areviws of mycotoxins in indoor air. *J.Toxical. Environ. Health*. 38 (2), p.183- 198.

IPCS, (1990).Selected Mycotoxins: Ochratoxins, trichothecenes, ergot – Environmental Health Criteria 105, W.H.O.Geneve, p. 263.

Jennings, D. H., et Lysek, G. (1996). Fungal biology: understanding the fungal lifestyle, Bios Scientific Publishers Ltd.

Joffin, N. (2013). Les techniques de laboratoires utilisées en mycologie, p. 1-20.
<http://www.techmicrobio.eu/index.php/microbio/mycologie/laboratoire>

Jouany, J.P.Y. (2002). Les mycotoxines dans les aliments des ruminants leur devenir et leur effets chez l'animal... INRA. *Pro. Anim.* 15(1), p. 3-16.

Julien, R. (2002). Les moisissures parlons-en. *Objectif prévention.* 25 (4), p. 7-8.

Krska, R. (2009). Mycotoxins. *Anal Bioanal Chem.* 395, p. 1203–1204.

Lacey, J. (1986). Factors affecting mycotoxin production. In: *Mycotoxins and phycotoxins* (edited by Steyn, P.S. and Vleggaar, R.), 6th International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins, Pretoria, South Africa.

Landy, E.T. et Jones, G.M. (2006). What is the fungal Diversity of marine Ecosystems in Europe? *Mycologist*, 20, p. 15-21.

Langseth, W., Rundberget, T. (1998). Instrumental methods for determination of non-macrocylic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. *J. Chromatogr. A*, 815, p. 103-121.

Langseth, W., Hoie, R., Gullord, M. (1995). The influence of cultivars, location and climate on deoxynivalenol contamination in Norwegian oats 1985-1990. *Acta Agriculturae Scandinavica, section B: Soil and Plant Science*, 45, p. 63-67.

Larousse Agrigole, (1981). Larousse. Paris. France, p. 262.

Le Bars, J., et P. Le Bars. (1987). Les moisissures des denrées alimentaires et leurs séquences. Conférence de la « Section Midi-Pyrénées ». Toulouse.

Le Bars, J., et P. Le Bars. (1982). Facteurs de l'accumulation d'acide pénicillique dans les denrées d'origine végétale. *Science des Aliments*, 2(hors-série II), p. 29-33.

Leclerc, H., Izard, D., Ohusson, M., Wattre, P. et Jakubczake. (1983). *Microbiologie générale.* p. 26-27.

Leclerc, F. C., Papon, N., Noel, T., Villard, J.(2005). Moisissures et risques alimentaires (Mycotoxicooses). *Revue Francophone des Laboratoires*. 373, p.61-66.

Lipps, P.E., Deep, I.W.(1991).Influence of tillage and crop rotation on yield, stalk rot and recovery of *Fusarium* and *Trichoderma* spp. from corn. *Plant Disease*, 75, p.828- 833.

Locquin, M.(1984). Mycologie générale et structurale .Ed. Masson,p .551.

Lugauskas, A. (2005). Potential toxin producing micromycetes on food raw material and products of plant origin. *Botanica Lithuanica* [Suppl. 7], p.3-16.

Lugauskas, A., Raudoniene, V., Sveistyte, L. (2005). Toxin producing micromycetes on imported products of plant origin. *Ann Agric Environ Med*. 12[1], p. 109-118.

Lund, F. et J.C. (2003).Frisvard..*Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *J. Appl. Microbiol*. 95, p.1117-1123.

Maheux, L. (1998). Session on microbial contamination occupational and environmental health services agency, (edn) Health Canada. Canada.

Marco, I., Hazrat, A., Lankhorst, P., Hankemeier, T. (2013). Novel Key Metabolites Reveal Further Branching of the Roquefortine/Meleagrins Biosynthetic Pathway. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, Inc, p. 1-15.

Marin, S., Sanchis, V., Arnau, F., Ramos, A.J., Magan, N. (1998). Environmental factors in vitro interactions and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F.20 graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research*, 102, p. 831-837.

Marquardt, R.R., Frohlich, A.A., (1992), A review of recent advances in understanding ochratoxicosis, *J. Anim. Sci.*, 70, p. 3968-3988.

Mathiew, R. (1995). *Biologie Campbell*, (edn) ISBN Canada.

Monbaliu, S., Van Poucke, C., Van Peteghem, C., Van Poucke, K., Heungens, K., De Saeger, S. (2009). Development of a multi-mycotoxin liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for sweet pepper analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, p. 3-11.

Nelson, P.E., Plattner, R.D., Shackelford, D.D., Desjardins, A.E., (1992). Fumonisin B₁ production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, p.986-989.

Nicklin, J., Graeme-Cook, K., Paget, T. et Killington, R. (2000). L'essentiel en microbiologie. Berti. Paris, p. 210-216.

Nielson, K.P., Graversen, S., Nielson, P.A., Anderson. Thram, U. et Frivad, J.C. (1999). Production of mycotoxins on artificially and naturally infected building materials. *Mycopathologia.* 145 (1), p.43-56.

Nielson, K.F. et Smedsgaard, J. (2003). Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *Journal of Chromatography A*, 1002, p.111-136.

Norred, W., Plattner, R.D., Vesonder, R.F., Bacon, C.W., Voss, K.A. (1992). Effect of selected secondary metabolites of *Fusarium moniliforme* on unscheduled synthesis of DNA by rat primary hepatocytes, *Food Chem. Toxicol.*, 30, p. 233-237

O'Brien, H. E., Parrent, J. L., Jackson, J. A., Moncalvo, J.M. et R. Vilgalys (2005). "Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples." *Applied and Environmental Microbiology* 71(9), p. 5544-5550.

Olsen, M., Jonsson, N., Magan, N., Banks, J., Fanelli, C., Rizzo, A., Haikar, A., Dobson, A., Frisvad, J., Holmes, S., Olkku, J., Persson, S. J., Börjesson, T. (2003). Prevention of Ochratoxin A in Cereals. OTA PREV. Final Report. Quality of Life and Management of Living Resources. Project No. QLK1-CT-1999-00433.

OMS. (1980). Mycotoxines. Critères d'hygiène de l'environnement 11. publications. De l'OMS. Genève. P.142.

Osweller, G.D., Ross, P.F., Wilson, T.M., Nelson, P.E., Witte, S.T., Carson, T.L., Rice, L.G., Nelson, H.A.(1992).Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screenings, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4, p.53-59.

Oteng-Gyang, K. (1984). Introduction a la microbiologie alimentaire dans les pays chaud.

Pardo, E., Marin, S., Solsona, A., Sanchis, V., Ramos, A.J.(2004).Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* affected by water activity and temperature on a barley-based medium. *Food Microbiol.*, 21, p. 267– 274.

Patidar, P., Agrawal, D., Banerjee, T., Patil, S. (2007).Optimisation of process parameters for chitinase production by soil isolates of *Penicillium chrysogenum* under solid substrate fermentation. *Process Biochem.* 40, p. 2962–2967.

Pamel, E. V., Vlaemynek, G., Heyndrickx, M., Herman, L., Verbeken, A., Daeseleire, E. (2010). Mycotoxin production by pure fungal isolates analysed by means of an uhplc-ms/msmultimycotoxin method with possible pitfalls and solutions for patulin-producing isolates. *MycotoxRes*, p. 1-11.

Patterson, T. F., McGinnis, M. R. (2009). The fungi: description. Site Doctor Fungus. Mycoses Study Group.

Pereira, S. (2006). Antimicrobiol activity of inbugoserasussruticesa.

Pitt, J.I. (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, U.K. p.324.

Pitt, J.I.(1998).Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 149 (6), p. 479-492.

Pitt, J.I.(2000), Toxigenic fungi and mycotoxins, *Br. Med. Bull.*, 56 (1), p.184 - 192.

Pohland, A.E., Nesheim, S., Friedman, L. (1992). Ochratoxin A, a review, *Pure, Appl. Chem.*, 64, p. 1029-1046.

Quillien, J-F. (2002). Les mycotoxines. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) - Centre de Réseaux pour l'Innovation en Agriculture et Agroalimentaire (CRIAA), Paris, France, p. 1-24.

Roquebert, M. (2002). Moisissures contaminant les biens culturels. Collection Patrimoine.

Ross, P.F., Rice, L.G., Osweiler, G.D., Nelson, P.E., Richard, J.L., Wilson, T.M. (1992). A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates, *Mycopathologia*, 117, p. 109-114.

Samson, RA., Hoekstra ES. (1984). Introduction to food and airborne fungi. 6th, 389 p. Baarn, Central bureau voor Schimmellcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.

Soekwon, K. (2006). Antibacterial and antisugal activity of sulfur containing compounds from *Petizenia alliaceae*.

Spanjer, M.C., Rensen, P.M., Scholten, J.M. (2008). LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Addit. Contam. Part A*, 25, p. 472-489.

Stanier, R., Doudoroff, M., Adelberg, A. (1966). Microbiologie générale. Deuxième édition Masson et éditeur 120, Boulevard saint germain, Paris, P. 88.

Sugita-Konishi Y., Nakajima, M., Tabata, S., Ishikuro, E., Tanaka, T., Norizuki, H., Itoh, Y., Aoyama, K., Fujita, K., Kai, S., Kumagai, S. (2006), Occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, and fumonisins in retail foods in Japan, *J Food Prot.*, 69 (6), p. 1365-1370.

Sunesson, A. L., Nilsson, C. A., Andersson, B., et Blomquist, G. (1996). Volatile metabolites produced by two fungal species cultivated on building materials. *Ann Occup.Hyg.* 40[4], p. 397-410.

Tabuc, C.(2007) *Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines*. Institut national polytechnique de Toulouse et de l'université de Bucarest. Toulouse.

Tachenon, A. (1999). La Science des champignons. [http:// www.tachenon. Com](http://www.tachenon.com)

Takahashi, J.A., Monteiro de Castro, M.C., Souza, G.G., Lucas, E.M.F., Bracarense, A.A.P., Abreu, L.M., Marriel, I.E., Oliveira, M.S., Floreano, M.B., Oliveira, T.S. (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, p.198-204.

Takino, M., Tanaka, T., Yamaguchi, K., Nakahara, T. (2004). Atmospheric pressure photoionization liquid chromatography/mass spectrometric determination of aflatoxins in food. *Food Addit. Contam.*,21, p.76-84.

Tanaka, T., Yoneda, A., Inoue, S., Sugiura, Y., Ueno, Y. (2000). Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gaschromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 882,p. 23-28.

Thibault, N. Burgat, V. et al., (1997). "Les fumonisines: nature, origine et toxicité." *Revue MédVét* 148(5), p. 369-388.

Thom, C.(1910). Cultural studies of species of *Penicillium*. *Bulletin of the Bureau of Animal Industry, USDA* 118, p. 1–109.

Tortora, J., Funk, B.F. et Case, Ch.l. (2003). *Introduction à la microbiologie*, (edn)ISBN.Canada.

Tortorano, A., Cabrini, E., Viviani, M. (1979). Sensibilité in vitro des levures a cinq antibiotiques. Comparaison de deux méthodes. CMI. En gelose et methode des disques. Bull. Soc. Fr.Myc. Med. 8, p. 69-74.

Uchikoba, T., Mase, T., Arima, K., Yonezawa, H. et Kaneda, M. (2001). Isolation and characterization of a trypsin-like protease from *Trichoderma viride*. *Biol. Chem.* 382, p. 1509-1513.

Urbanek, H., Yirdaw, G. (1984). Hydrolytic ability of acid protease of *Fusarium culmorum* and its possible role in phytopathogenesis. *Acta Microbiol. Pol.* 33 (2), p. 131.

Vainio, H., Magee, P., McGregor, D., McMichael, A., (1992). Mechanisms of Carcinogens in Risk Identification, IARC Scientific Publications No 116, IARC, Lyon.

Varga, J., Kevei, E., Rimyu, E., Teren, J., Kazakiewicz, Z., (1996). Ochratoxin production by *Aspergillus* species, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, p. 4461-4464.

Van der Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L., De Scott, B., Theron, J.J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 1965, 205, p. 1112-1113.

Vega, K. et Kalkum, M. (2012). "Chitin, Chitinase Responses, and Invasive Fungal Infections." *International Journal of Microbiology* 2012.

Vinokurova, N.G., Zelenkova, F. Baskunov, P. (2001). Determination of diketopiperazine alkaloids of roquefortine group. *Journal of analytical chemistry*. Vol (56). N°3, p. 258-259.

Vrabcheva, T., Usleber, E., Dietrich, R., Märtilbauer, E. (2000). Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy, *J Agric Food Chem.*, 48 (6), p. 2483-2488.

Vrabcheva, T., Petkova-Bocharova, T., Grosso, F., Nikolov, I., Chernozemsky, I.N., Castegnaro, M., Dragacci, S., (2004). Analysis of ochratoxin A in foods

consumed by inhabitants from an area with balkan endemic nephropathy: a 1 month follow-up study, *J Agric Food Chem.*, 52 (8), p. 2404-2410.

Whitlow, W. et Hagler, W.M.(2001). *Mycotoxin contamination of feedstuffs - An additional stress factor for dairy cattle.* in *25^e symposium sur les bovins laitiers.* Quebec.

Willie, T.D, et Morehouse, L.G. (1977). *Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses: Mycotoxic fungi and chemistry of mycotoxins,* p. 538.

Site web

<https://www.caymanchem.com>

<http://www.chemspider.com>

www.google.fr

Annexes

Annexes

Annexe 01 : milieu d'isolement

Milieu Sabouraud (Botton *et al.*, 1990).

Peptone.....	10g
Glucose.....	20g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml
pH.....	5,6

Milieu Coconut Extract Agar (CEA)

Cent grammes de la noix de coco déchiquetée ont été homogénéisés pendant 5 minutes avec 300 ml d'eau distillée chaude. La solution est filtrée à l'aide du tissu. L'agar a été ajouté (20 g/litre). Le mélange a été alors stérilisé à l'autoclave à 121°C/15 minutes. Le pH final est de 7,0.

Annexe 02 : Colorant des cultures

Bleu au lactophénol (Chabasse *etal.*, 2002).

Phénol cristallisé pur.....	10g
Acide lactique.....	10g
Glycérine.....	20g
Bleu Coton C4B(ou Bleu de méthyle).....	0.25g
Eau distillée.....	10ml.

Annexe 03 : Rapport Frontal

Distance parcourue par un constituant

$$\text{RF} = \frac{\text{Distance parcourue par un constituant}}{\text{Distance parcourue par l'éluant}} \quad (\text{Sans unité})$$

Calcule du rapport frontal

$$\text{RF} = \frac{3.5}{4.2} \longrightarrow \boxed{\text{RF}=0.83}$$

Annexe 04 : Test d'antibiose

Gélose Mueller-Hinton (MH) (www.microbiologie-medicale.fr).

Infusion de viande de bœuf.....	300 ml
Peptone de caséine.....	17,5g
Amidon de maïs.....	1,5g
Agar.....	17g
pH.....	7,4

Benayache Amina Behnas Djihad	Date de soutenance : 24/06/2015
<u>Intitulé</u> : Extraction et identification des mycotoxines de <i>Penicillium chrysogenum</i>	
<u>Laboratoire</u> : Microbiologie. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université des Frères Mentouri Constantine.	
<p>Résumé</p> <p>Les moisissures sont des contaminants fréquents de nombreux substrats végétaux et de certains produits d'origine animale. Leur présence peut améliorer les qualités organoleptiques du produit ou, au contraire, l'altérer et conduire à l'accumulation de métabolites secondaires toxiques : les mycotoxines.</p> <p>L'objectif de ce travail a été de caractériser les mycotoxines produites par <i>P. chrysogenum</i> après identification de la souche sur milieux solides CEA et Sabouraud. Pour cela les mycotoxines secrétées sont extraites sous forme de disques de gélose et prélevées à l'aide d'un emporte-pièce, puis dissoutes dans le méthanol. Le test d'antibiose est réalisé par la méthode des puits dans des boîtes de pétri contenant le milieu Muller-Hinton ensemencé par <i>Escherichia coli</i>. L'extrait préparé précédemment a subi une chromatographie sur couche mince (CCM) Système : Butanol/Acide acétique/Eau (1/1/1) V/V et HPLC utilisant le mélange acétonitrile/ eau (10/10) V/V comme phase mobile.</p> <p>Les résultats ont montré une croissance importante de <i>P. chrysogenum</i> dans le milieu Sabouraud et les molécules de mycotoxines secrétées sont détectées dans les boîtes sous une lampe UV à 365nm en donnant une coloration bleutée. Le test d'antibiose a donné un résultat significatif sur la souche d'<i>Escherichia coli</i> avec des diamètres dépassant 17mm. La CCM a montré l'apparition d'une tache orange à violette ayant un Rf=0.83, tandis que l'HPLC a mis en évidence la roquefortine C à environ 15 min. Ces résultats ont mis en évidence la roquefortine C, utilisée dans l'industrie fromagère, et qui est en plus dotée de propriétés antibactérienne.</p>	
Mots clés : <i>P. chrysogenum</i> ; Roquefortine C; Mycotoxines; CCM; HPLC; Test d'antibiose	
<p>Devant le jury :</p> <p>Président : KACEM CHAOUICHE N. (prof – UMC Constantine).</p> <p>Rapporteur : LAHLAH F .Z. (M.A.A – UMC Constantine).</p> <p>Examineur : KARA ALI M. (M.A.A – UMC Constantine).</p>	