



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

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



Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : ميكروبيولوجيا

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 des Mycètes, Fermentation et Production de Substances Fongiques

Intitulé :

Etude de l'effet antihépatotoxique d'une plante médicinale du genre *lycium*

Présenté et soutenu par : *Belaib Meroua*
Bouhala Imene

Le : 12/06/2016

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr. DEHIMAT L. (Professeur - UFM Constantine).

Rapporteur : Mme. YOUCEF ALI M. (MCB - UFM Constantine).

Tuteur : Mme. MOSBAH K. (MAA – UFM Oum El Baoughi).

Examinatrice : Mme. ZITOUNI H. (MAB- UFM Constantine).

Année universitaire
2015 - 2016

Remerciements

Ce travail a abouti grâce à dieu, notre créateur tout puissant, qui m'a donné la volonté, la patience et la force, pour l'achever. Gracieux remerciements.

Nous tenons à adresser nos remerciements les plus sincères et chaleureux à Mme YUCEF ALI M d'avoir assuré notre encadrement.

*Nous rendons un vibrant hommage aux du jury de ce mémoire qui ont accepté de juger
travail :*

Un merci particulier à notre présidente de jury, Mr. DEHIMAT L., de nous avoir faites l'honneur d'accepter la présidence du jury de mémoire.

Un Merci Particulier à l'examinatrice de ce mémoire ; Mme ZITOUNI H., pour avoir accepté d'examiner et évaluer notre travail.

Egalement ; nous remercions Mme MOSBAH K, pour sa gentille, ses précieux conseils, sa bienveillance et son soutien tout au long de la réalisation de notre mémoire.

Notre remerciement s'adresse à tous les doctorants du laboratoire LaMyBAM pour son aide pratique et son soutien moral et ses encouragements.

En fin, nous remercions tous ceux qui nous ont aidé et ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

A mes très chers parents,

Auxquels je dois ce que je suis. Que Dieu vous protège

A mes chères sœurs et frères

Pour leur amour et leur incontestable appui

A mes chéries amina et abir

Pour tous les instants inoubliables que j'ai passés avec vous, je vous aime

beaucoup.

A tous mes chers amis,

A toute ma famille.

Je dédie ce travail à toutes les personnes chères à mon cœur.

I M E N E

DEDICACE

A ma Chère Mère

A mon Père

*Dont le mérite, les sacrifices et les
qualités humaines m'ont permis de
vivre ce jour.*

A mes Frères et mes sœurs

*A tous mes amis et les gens qui
m'aiment*

Meroua

Table des matières

1. Introduction.....	1
2- Revue bibliographique.....	3
2.1- Principales moisissures mycotoxinogènes.....	3
2.1.1- Le Genre <i>Aspergillus</i>	4
2.1.1.1- Généralités.....	4
2.1.1.2- Description morphologique.....	4
2.1.2- <i>Aspergillus flavus</i>	5
2.1.3- Classification.....	6
2.1.4- <i>Aspergillus flavus</i> et production des mycotoxine.....	6
2.1.4.1- Aflatoxines.....	6
2.1.4.2- L'Aflatoxine B1 (AFB1).....	7
2.1.4.3- Propriétés physico-chimiques des Aflatoxines.....	8
2.1.4.4- Biosynthèse d'aflatoxine B1.....	9
2.1.4.5- Mécanisme d'action toxique et effets biochimique de l'Aflatoxine B1.....	10
a) Toxicité Aigüe.....	10
b) Toxicité Chronique.....	11
c) La Mutagénicité.....	11
d) La Tératogénicité.....	11
2.2- La plante <i>Lycium</i>	12
2.2.1- Plantation dans le monde.....	12
2.2.2- Ecologie et Culture.....	13
2.2.3- Classification.....	14
2.2.4- Caractéristiques du genre <i>Lycium</i>	14
2.2.5- Principaux constituants.....	15
2.2.6- Les Propriétés thérapeutiques de <i>lycium</i>	15
2.2.6.1- Inhibe la croissance des cancers.....	15
2.2.6.2- Renforcement du système immunitaire.....	16
2.2.6.3- Effet régulateur du diabète de type 2, hypolipémiant et antihypertenseur.....	16

2.2.6.4-Effet neuroprotecteur dans les maladies neurodégénératives.....	17
2.2.6.5-Effet protecteur de la vision, contre le glaucome, la dégénérescence maculaire et la cataracte	17
3-Matériel et Méthode.....	18
3.1-Production d'Aflatoxine B1 par <i>Aspergillus flavus</i>	18
3.1.1- Caractères cultureux et morphologiques d' <i>A. flavus</i>	18
a)Observation par la technique de scotch.....	18
b) Observation à l'état frais.....	18
3.1.2- Fermentation sur milieu Y.E.S	19
3.1.3- Extraction des aflatoxines.....	19
3.1.4- Analyse par chromatographie sur couche mince (C.C.M).....	21
3.1.4.1- Séparation chromatographique.....	21
3.1.4.2- Calcul du rapport frontal (Rf).....	21
3.2- Extraction de molécules bioactives à partir de la plante <i>lycium</i>	21
3.2.1- Matériel végétal.....	21
3.2.2- Préparation des extraits et extraction des biomolécules.....	22
3.2.3- Calcul du rendement.....	24
3.3- Étude <i>in vivo</i> de l'effet anti-hépatotoxique de <i>lycium</i>	24
3.3.1- Animaux et conditions d'hébergement.....	24
3.3.2- Répartition des souris.....	24
3.3.3- Administration.....	25
3.3.4-Observations.....	25
3.3.5- Évolution du poids corporel des souris.....	25
3.3.6- Prélèvement sanguin.....	26
3.3.7- Sacrifice des animaux.....	26
3.3.6- Détermination du bilan hépatique.....	26
➤ Principe de la réaction des transaminases.....	26
➤ Principe de phosphatase alcaline.....	27
4. Résultats et discussion.....	28
4.1- Production d'Aflatoxine B1 par <i>Aspergillus flavus</i>	28

4.1.1-Caractères culturaux et morphologiques d' <i>A. flavus</i>	28
4.2- Fermentation sur milieu YES.....	29
4.2.1- Extraction des aflatoxines.....	29
4.2.1.1- Filtration.....	29
4.2.1.2- Extraction	30
4.2.1.3- Séparation par chromatographie sur couche mince (CCM).....	31
4.3- Extraction de molécules bioactives à partir de la plante <i>lycium</i>	32
4.4- Étude <i>in vivo</i> de l'effet anti-hépatotoxique de <i>lycium</i>	34
4.4.1-Signes de toxicité.....	34
4.4.2-Poids corporel.....	35
4.4.3-Poids du foie.....	36
4.4.4-Dosage de transaminase.....	37
4.4.5-Dosage de phosphatase alcaline.....	39
5-Conclusion.....	41
6- Abstrat	42
7- Références bibliographiques	45
8- Annexe	

Liste des figures

Figure1 Principaux caractères morphologiques des <i>Aspergillus</i>	5
Figure 2 <i>Aspergillus flavus</i> (culture de 7 jours sur gélose au malt à 25°C et aspect microscopique).....	6
Figure3 structure de l'aflatoxine B1.....	8
Figure4 Structures chimiques et masses molaires (en g) des différentes aflatoxines.....	8
Figure 5 Voie de biosynthèse de l'aflatoxine B1 de l' <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i>	9
Figure 6 Métabolisme hépatique de l'aflatoxine B1.....	12
Figure 7 Distribution du genre <i>Lycium</i> dans le monde.....	13
Figure 8 cultures et récolte du Goji.....	13
Figure 9 planches botaniques de <i>Lycium</i>	15
Figure 10 Procédé d'extraction des mycotoxines.....	20
Figure11 Le <i>Lycium</i> (A). dans son milieu naturel, (B). Les feuilles de la plante.....	22
Figure12 le protocole d'extraction de différentes phases.....	23
Figure13 Injection de l'extrait de <i>Lycium</i> par gavage oral.....	25
Figure 14 Aspect des colonies d' <i>A. flavus</i> sur milieu PDA: (a). face ; (b). revers.....	28
Figure 15 Aspect microscopique d' <i>Aspergillus flavus</i> sous microscope optique : (A). à grossissement x40, (B). à grossissement x 100.....	29
Figure16 filtration du la culture obtenue sur papier wattman N° 01.....	30
Figure 17 Décantation dans une ampoule à décanter.....	30
Figure 18 Extrait chloroformique après concentration.....	31
Figure19 Chromatographie sur couche mince présentant les spots d'AFT B1 produite par <i>A. flavus</i> après 14 jours de fermentation. Séparée sur gel de silice par l'éluant toluène, acétate d'éthyle et l'acide formique de volume (5 : 4 : 1) respectivement sous lumière UV 365.....	32
Figure20 extrait à partir des feuilles de <i>Lycium</i> dans la phase chloroformique.....	33
Figure21 extrait à partir des feuilles de <i>Lycium</i> dans la phase d'acétate d'éthyle.....	33
Figure22 extrait à partir des feuilles de <i>Lycium</i> dans la phase butanolique	33
Figure 23 histogrammes rendement de l'extrait.....	34

Figure24 Évolution du poids des souris témoins et traités durant une semaine.....	35
Figure25 Effet de l' AFB1 sur le poids des foies des souris traitées.....	37
Figure26 Paramètres sériques de l'évaluation de la fonction hépatique (GPT, GOT et PAL) des souris traités par la dose de 500mg/kg de l'extrait ACT et BUT et témoins dans les conditions de la toxicité aigüe par la dose de 0,7mg/kg de l' AFB1.....	40

Liste des Tableaux

Tableau 1 moisissures et mycotoxine retrouvées dans certains aliments.....3

Tableau 2 Caractères macroscopiques d'*Aspergillus flavus*.....28

Liste des abréviations

ACT: acétate d'éthyle.

AFB1: Aflatoxine B1.

AFB2: Aflatoxine B2.

AFG1: Aflatoxine G1.

AFG2: Aflatoxine G2.

AFM1: Aflatoxine M1.

AFM2: Aflatoxine M2.

ALAT = SGPT : transaminase glutamique pyruvique.

ASAT = SGOT : Transaminase glutamique oxalo-acétique.

BUT: butanol.

CCM : Chromatographie sur Couche Mince.

CIRC : Centre International de la Recherche sur le Cancer.

CMV : Complexe minéro-vitaminique.

FAO : organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.

MDA: Malon dialdéhyde.

OMS : Organisation mondiale de la Santé.

PAL : Phosphatases alcalines.

PDA: Potatoes Dextrose Agar.

RF: Rapport Frontal.

UV: Ultra-Violet.

YES: Yeast Extract Sucrose.

1-Introduction

1. Introduction

Pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal, voire l'unique recours de la médecine, cependant, malgré le développement de l'industrie pharmaceutique qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies qui étaient souvent mortelles, les plantes médicinales et les remèdes qu'on pouvait en tirer ne furent jamais totalement abandonnés et les gens ne cessèrent jamais de faire appel à la médecine traditionnelle, ce qui a conduit à maintenir vivante les traditions thérapeutiques laissées par nos ancêtres.

L'utilisation des plantes en phytothérapie est très ancienne et connaît actuellement un grand intérêt auprès du public, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2003, environ 65-80% de la population mondiale à recours à la médecine traditionnelle pour satisfaire ses besoins en soins de santé primaire, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne (Ma *et al.*, 1997). Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs (Ameenah, 2006). Ces plantes médicinales renferment de nombreux principes actifs où certains sont issus du métabolisme secondaire. Les plantes produisent déjà 70% de nos médicaments, déjà environ 170 000 molécules bioactives ont été identifiées à partir de plantes (Chaabi, 2008).

Par ailleurs, Les mycotoxines sont des substances toxiques pour l'homme et les animaux, élaborées par des moisissures développées dans les denrées alimentaires (Moreau, 1974). Les intoxications liées à ces substances peuvent se manifester par des syndromes forts variés : gastro-entérites, hémorragies, convulsions, paralysies. Mais surtout lésions des reins et du foie; dans certains cas, ces dernières peuvent se traduire par des cancers. De plus, L'exposition à ces mycotoxines est à l'origine de toxicités aiguës, subchroniques et chroniques en engendrant des effets délétères sur le système nerveux central, l'appareil cardiovasculaire, l'appareil respiratoire, l'appareil digestif et le système urinaire. Elles peuvent aussi induire des effets hépatotoxiques, mutagènes, carcinogènes, tératogènes et immunosuppresseurs (Bennet et Klich, 2003 ; Afssa, 2006).

De ce fait, notre travail vise à évaluer l'effet hépatoprotecteur de la plante *Lycium* chez un modèle de souris hépatotoxique par l'administration de la mycotoxine Aflatoxine B1 produite par une souche d'*Aspergillus flavus*. En effet, le travail s'articule sur :

- La production d'Aflatoxine B1 par *Aspergillus flavus*;
- L'extraction et l'analyse chromatographique des aflatoxines produites sur couche mince (C.C.M);
- L'extraction des extraits n- butanolique et acétate d'éthyle à partir de la plante *lycium* ;
- L'étude *in vivo* de l'effet anti-hépatotoxicose des extraits de *lycium*.

2-Revue bibliographique

2. Revue bibliographique

2.1- Principales moisissures mycotoxinogènes

Les mycotoxines sont produites par 5 genres de champignons : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria* (Miller et Trenholm, 1994). Plusieurs sortes de mycotoxines sont retrouvées dans les aliments (tableau 1), seules certaines contaminent l'alimentation humaine et sont toxiques pour la santé humaine. Les plus importantes sont : les aflatoxines, les ochratoxines, les trichothécènes, la stérigmatocystine, la zéaralénone, la citrinine, la patuline, l'acide pénicillique, les fumonisines (D'Mello et McDonald, 1997 ; Scudamore et Livesey, 1998). Les mycotoxines sont produites soit, dans le champ lors du développement de la plante (toxines du champ) soit, après la récolte (toxine du stockage) (AFSSA, 2009). De manière générale, les conditions environnementales nécessaires à la production de mycotoxines sont plus étroites que celles permettant la croissance fongique (Tabuc, 2007).

Tableau 1 : moisissures et mycotoxine retrouvées dans certains aliments (Nguyen, 2007).

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

2.1.1-Le Genre *Aspergillus*

2.1.1.1-Généralités

Les *Aspergillus* sont des moisissures largement distribuées dans la nature grâce à leur capacité de produire un grand nombre de spores aéroportées et facilement transmissible par le courant d'air, de plus la majorité de ces espèces n'ont pas de besoins nutritionnels particuliers (Bennett, 2010). Les espèces d'*Aspergillus* se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires et les céréales (Gugnani, 2003). Ce genre comprend plus de 200 espèces (Bennett, 2009) définies d'après les caractères de l'appareil reproducteur (Botton *et al.*, 1990). Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'homme et les animaux par leur pouvoir d'envahir les tissus vivants et de provoquer des aspergilloses, particulièrement chez les personnes immunodéprimées (Bennett, 2010). Certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes et d'acides organiques (Botton *et al.*, 1990 ; Ward *et al.*, 2006).

2.1.1.2-Description morphologique

Aspergillus est un genre fongique anamorphe (forme asexuée) se reproduisant par production de conidies se formant à l'extrémité de phialides. Les *Aspergillus sp* possèdent un mycélium végétatif constitué d'hyphes septés hyalins portant des conidiophores de forme caractéristique permettant leur identification au niveau du genre (figure1). Ces conidiophores sont les structures permettant la production végétative. Ils sont constitués d'un stipe non ramifiés se dressant à partir des hyphes végétatifs et se terminant par une vésicule dont la forme varie selon l'espèce (globuleuse, sphérique, pyriforme, claviforme ou en forme de spatule). Chez certaines espèces, les phialides produisant les conidies sont directement formées sur la vésicule, on parle de forme unisériée. D'autres espèces possèdent une autre structure entre la vésicule et les phialides, nommée métule ; ces espèces sont dites bisériées. Une des particularités des *Aspergillus* par rapport aux autres genres fongiques est que les phialides et métules apparaissent simultanément sur les vésicules (klich, 2002).

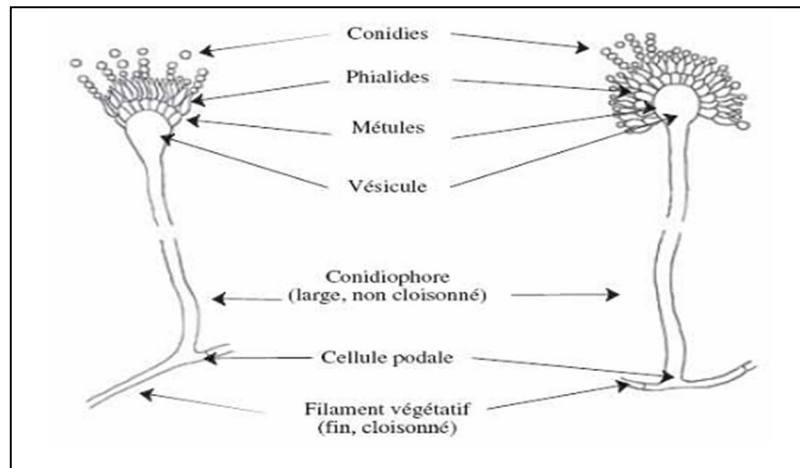


Figure 1 : Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus* (Botton *et al.*, 1990).

De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont aussi connues pour leur capacité à produire des mycotoxines responsables de pathologies animales et humaines. Enfin, certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes, d'acides organiques (Botton *et al.*, 1990)

2.1.2- *Aspergillus flavus*

Ce champignon se développe rapidement sur les milieux classiques (géloses au malt et Sabouraud) à 22-25°C. La température optimale de croissance est 37°C. Sur le milieu de culture *A. flavus* forme des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaune, puis vert-jaune. Le revers peut être incolore, rosâtre ou brun-rouge foncé pour les souches productrices de sclérotés (Figure2) (Tabuc, 2007). Les têtes conidiennes, unisériées ou bisériées, d'abord radiées, puis reparties en plusieurs colonnes de spores mal individualisées, jaunâtres au début, puis vert-jaune foncé. Les conidiophores hyalins, verruqueux, atteignent 1 à 2,5 mm de long. Les vésicules sont sub-globuleuses, et mesurent 25 (10-65) à 45 µm de diamètre. Les phialides (6- 10 x 4-5,5 µm) sont insérées directement sur la vésicule (unisériées) ou portées par des métules. Les conidies sont globuleuses à sub-globuleuses, de 3-6 µm de diamètre, de couleur verte pâle, verruqueuses. Les sclérotés, fréquents dans les isolats récents, sont globuleux à sub-globuleux, d'abord blanc puis virant au brun-rouge foncé et au noir (Figure2) (Tabuc, 2007).

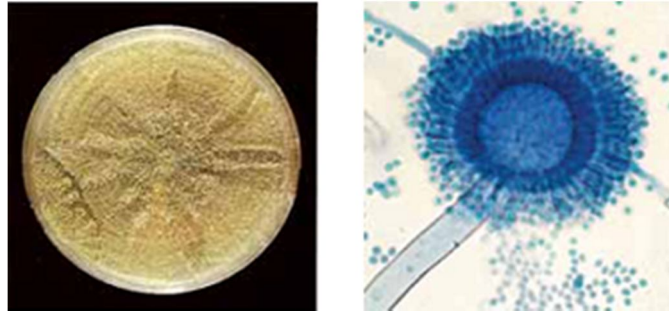


Figure 2 : *Aspergillus flavus* (culture de 7 jours sur gélose au malt à 25°C et aspect microscopique).

2.1.3-Classification

La classification des nombreuses espèces appartenant à ce genre *Aspergillus* est assez complexe : il a été divisé en 7 sous-genres eux-mêmes divisés en 17 sections se basant sur divers critères tels que la couleur des conidies, la forme et la taille des vésicules ou encore la présence d'une forme téléomorphe. Selon Klich, 2002, la classification de l'*Aspergillus flavus* est comme suit :

Règne : *Mycota*

Embranchement : *Eumycota*

Sous-embranchement : *Ascomycotina*

Classe : *Euascomycètes*

Ordre : *Eurotiales*

Famille : *Trichocomaceae*

Genre : *Aspergillus*

Espèce : *Aspergillus flavus*

2.1.4-*Aspergillus flavus* et production des mycotoxine

2.1.4.1-Aflatoxines

Les aflatoxines sont principalement produites par des espèces d'*Aspergillus* telles que *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. Ces deux espèces sont toutes deux productrices d'aflatoxines de type B mais l'espèce *Aspergillus parasiticus* produit également des aflatoxines de type G (Varga *et al.*, 2011). La famille des aflatoxines comprend plusieurs molécules. Les plus abondantes dans la nature sont les aflatoxines AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2 (Huffman *et al.*, 2010). Les aflatoxines AFM1 et AFM2 sont les métabolites des aflatoxines AFB1 et AFB2, issus de leur hydroxylation dans le foie des animaux exposés. Ces

métabolites représentent un danger en terme de santé publique car ils sont excrétés dans le lait, se fixent aux caséines et persistent dans les produits laitiers. Le pouvoir toxique des aflatoxines est principalement associé à l'aflatoxine AFB 1 qui est considérée comme le principal métabolite génotoxique et possède le plus fort potentiel cancérigène de toutes les aflatoxines.

L'organe cible étant le foie, l'aflatoxine AFB 1 est responsable de l'apparition de cancers hépatiques mais aussi d'aflatoxicoses aiguës. Cette dernière pathologie ressemble à une hépatite aiguë accompagnée de vomissements, de douleurs abdominales, d'ictères, d'œdèmes et pouvant parfois aller jusqu'au décès. Une des dernières épidémies d'intoxication aiguë par les aflatoxines a eu lieu en 2004 au Kenya. En 7 mois 317 cas ont été rapportés dont 125 décès par hépatite aiguë.

L'épidémie a été attribuée à la consommation de maïs fortement contaminé par des aflatoxines (Azziz-Baumgartner *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2005; Probst *et al.*, 2007). Les effets immunomodulateurs et immunotoxiques des aflatoxines ont été étudiés *in vitro* et *in vivo* (Bondy and Pestka 2000; Meissonnier *et al.*, 2008). Elles affectent la réponse inflammatoire en inhibant plusieurs fonctions des macrophages telles que la phagocytose, la production de radicaux oxygénés et la sécrétion de cytokines. L'aflatoxine AFB1 affecte aussi la fonction de reproduction.

En 1993, le CIRC a classé l'aflatoxine AFB 1 dans le groupe 1 (agent cancérigène), l'aflatoxine AFM1 dans le groupe 2B (agent peut-être cancérigène) et l'aflatoxine AFG1 dans le groupe 3 (agent inclassable quant à sa cancérigénicité) (Iarc ,1997).

2.1.4.2-L'Aflatoxine B1 (AFB1)

À la suite d'une maladie « Turkey X disease » qui a affecté la volaille en Angleterre, et plus particulièrement les dindons, Sargeant *et al.*, (1963) ont isolé de la nourriture de ces volailles à base d'arachide, une substance capable d'induire expérimentalement la même maladie. Ce fut le début d'une série de recherches qui aboutit en 1965 à l'isolement et à la caractérisation de la structure des aflatoxines (Asao *et al.*, 1963 et 1965).

Une des plus célèbres mycotoxines est possédant le profil toxicologique le plus sérieux, l'aflatoxine B1 (AFB1) dont le nom chimique est le suivant :

6-Méthoxydifurocoumarone2, 3,6 α , 9 α -tétrahydro-4-méthoxy-cyclopenta-[c]furo [3',2':4,5] furo[2,3-h][1]benzopyran-1,11-dione (figure 3).

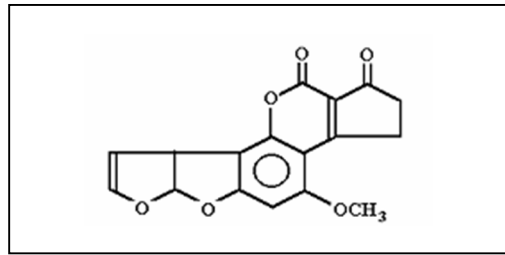


Figure 3 : structure de l'aflatoxine B1.

Des dérivés secondaires de l'AFB1 (AFB2, AFG1, AFG2, AFM1) ont été identifiés. Ils sont caractérisés au niveau moléculaire par des structures de coumarines bifuraniques auxquelles sont accolées des pentanones (AFB) ou des lactoses hexatomiques (AFG). Toutes les aflatoxines se rattachent à l'un de ces deux types de structure (AFB, AFG) et ne diffèrent entre elles que par la position de divers radicaux sur le noyau. Les structures chimiques ainsi que les masses molaires de ces différents dérivés sont représentés dans la (figure 4).

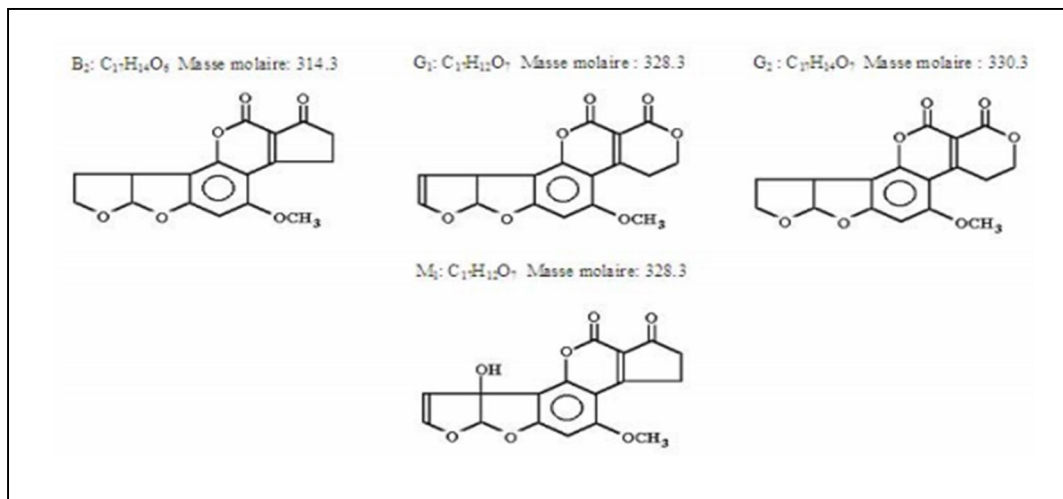


Figure 4 : Structures chimiques et masses molaires (en g) des différentes aflatoxines.

2.1.4.3-Propriétés physico-chimiques des Aflatoxines

Les aflatoxines sont des cristaux incolores ou jaune pâle-fluorescents de façon très intense sous une lumière ultra-violette. Les aflatoxines B1 et B2 émettent une fluorescence bleue et les aflatoxines G1, G2, une fluorescence vert jaune. Ces couleurs de fluorescence sont à l'origine du nom des mycotoxines (B pour Blue et G pour Green). L'aflatoxine M1 présente une fluorescence bleu-violette sous irradiation ultra-violette. Le M vient de Milk, car ce métabolite a été tout d'abord isolé du lait (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Leur stabilité est très variée : dans l'eau elles sont généralement peu solubles (10-30 mg.ml⁻¹) présentant une instabilité totale dans les solvants non polaires (Cole et Cox, 1981). Par contre elles sont très solubles dans les solvants organiques de polarité moyenne (CHCl₃, CH₃OH,

DMSO) (Cole et Cox, 1981). Les aflatoxines se trouvent instables sous la lumière ultraviolette en présence d'oxygène avec des pH extrêmes (pH < 3 ou pH > 10). Par oxydation le cycle lactone des aflatoxines devient sensible à une hydrolyse alcaline, mais en cas de neutralisation, il peut se reformer. Les aflatoxines sont aussi dégradées par l'ammoniaque (NH₄OH) et l'hypochlorite de sodium (NaOCl). Lors de cette dernière réaction, il se forme le 2,3-dichloro-aflatoxine B1 qui est directement génotoxique (Cole et Cox, 1981).

2.1.4.4-Biosynthèse d'aflatoxine B1

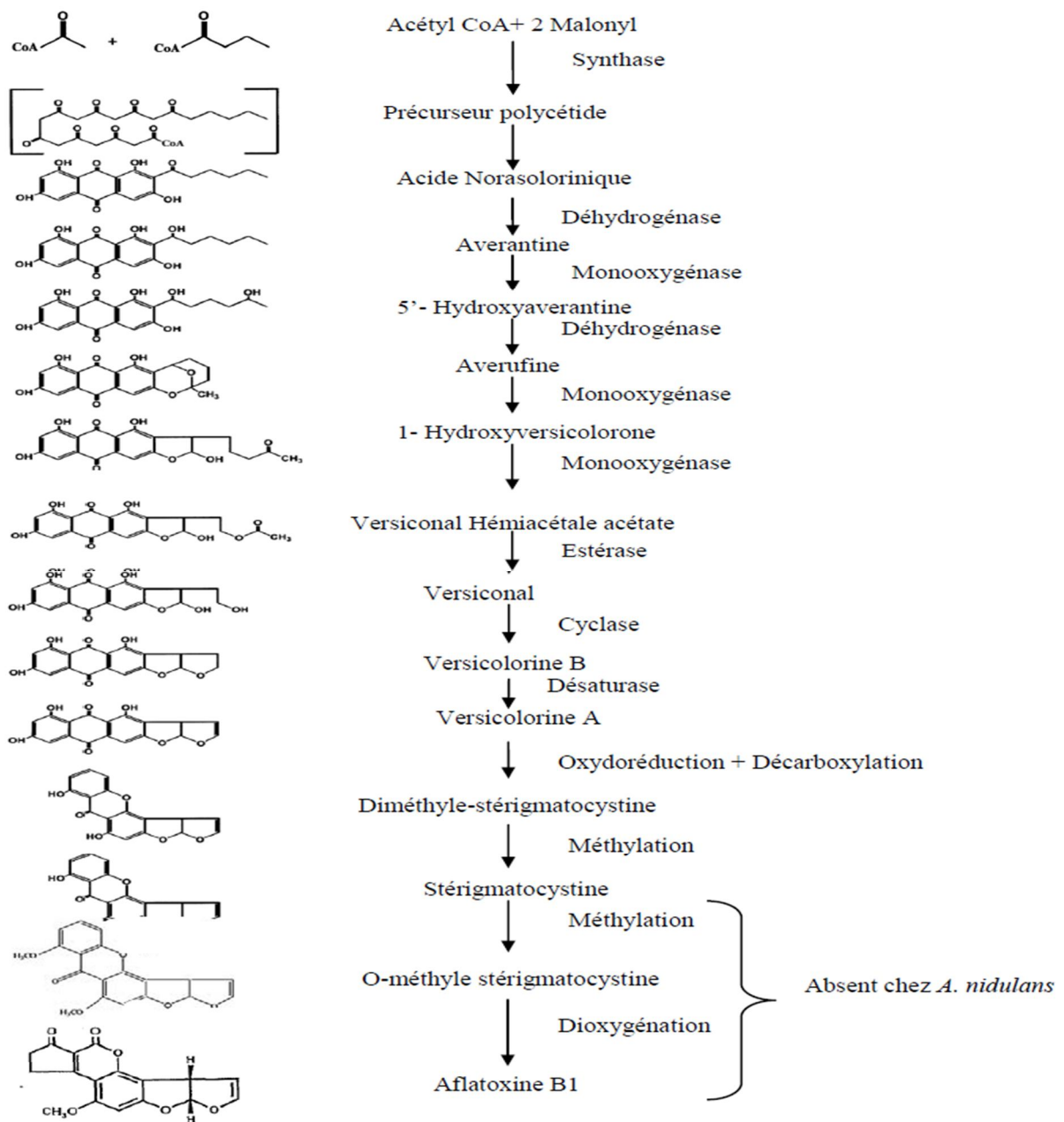


Figure 5 : Voie de biosynthèse de l'aflatoxine B1 de l'*A. flavus* et *A. parasiticus* (Wilkinson *et al.*, 2004).

2.1.4.5-Mécanisme d'action toxique et effets biochimique de l'Aflatoxine B1

La toxicité de l'aflatoxine B1 est liée aux effets biochimiques résultant de l'interaction de son dérivé époxy et les cellules hépatiques. Les différentes perturbations métaboliques observées sont :

1. l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques (ARN, ADN et mitochondriales) et des protéines (Wray, 1982).
2. la dégranulation précoce du réticulum endoplasmique du réticulum de l'hépatocyte (Patterson, 1976)
3. la disparition du contrôle en retour de la synthèse du cholestérol considérée comme une caractéristique de l'état précancéreux (FAO, 1979)
4. l'augmentation de la perméabilité cellulaire et l'interruption du transfert d'électrons au niveau des mitochondries, responsable de la forte baisse de la respiration cellulaire.
5. la perméabilité accrue des membranes lysosomiales conduisant à une fuite des hydrolases acides non liées.
6. Ainsi la nécrose hépatocellulaire aiguë semble résulter de l'interaction des aflatoxines en divers sites intracellulaires alors que la mutagénicité et la cancérogénicité de ces toxines sont subordonnées probablement à l'action métabolique d'un agent alkylant l'ADN, l'époxyde 2-3 (Carlborg, 1979).

a) Toxicité Aiguë

L'intoxication aiguë résulte de l'ingestion en un sème ou plusieurs fois rapprochées d'une dose assez importante d'aflatoxines et se traduit par la mort des animaux dans des délais variant selon la sensibilité spécifique. Par voie orale, la DL50 varie selon les espèces animales de 0,3 à 17,9 mg/kg de poids corporel et c'est le Lapin qui a la plus grande sensibilité. Généralement, l'organe qui souffre le plus est le foie et lors d'une intoxication aiguë il apparaît pille, décoloré, avec une augmentation de volume. On constate souvent des nécroses du parenchyme hépatique et des hémorragies. Si la mort n'est pas très rapide (une semaine), on note une prolifération caractéristique de cellules indifférenciées au niveau des espaces portes (Frayssinet et Lafont, 1966). Les reins peuvent présenter des lésions de glomérulonéphrites tandis que les phénomènes congestifs se produisent au niveau des poumons (Moreau, 1974). Dans certains cas d'intoxication subaiguë, l'ictère, l'hypoprothrombinémie, l'hépatome ou la gastro-entérite sont fréquents (Dia, 1997).

Chez l'homme, l'intoxication survient à la suite de l'ingestion souvent accidentelle d'une dose massive d'aflatoxine et les signes sont spectaculaires. L'intoxication aiguë a été rarement signalée chez l'homme mais toutefois, des cas ont été rapportés (Who, 1990). La mort des intoxiqués est précédé d'une anorexie, d'une dépression, d'une ataxie, d'une dyspnée et d'une hémorragie (Ngindu, 1982) et la biopsie montre un tissu hépatique nécrosé. Comme autre effet aigu observé en association avec les aflatoxines : le syndrome de REYE : qui est une maladie neurologique infantile dont les signes rappellent une encéphalopathie avec dégénérescence graisseuse des viscères ce qui aboutit à un coma convulsif et à la mort (Droreckova *et al.*, 1977 ; Rayner; Dollear, 1970). Dans chacun des cas, l'hépatotoxicité des aflatoxines se traduit par une nécrose hépatique avec dégénérescence graisseuse et prolifération des cellules biliaires (Ngindu, 1982).

b) Toxicité Chronique

Les aflatoxicoses chroniques surviennent à la suite d'ingestion répétées de faibles doses d'aflatoxines pendant des périodes plus ou moins longues et sont plus fréquentes, chez les animaux domestiques et chez l'homme (Moreau et Newberne, 1974). Différents de ceux liés à l'intoxication aiguë, les troubles consécutifs à une intoxication chronique ont pour premiers symptômes visibles une anorexie et un ralentissement de la croissance, voir même une perte de poids. Mais rapidement c'est le foie qui souffre le plus de l'activité toxique (Chaivu Rati *et al.*, 1975 et Prince *et al.*, 1975).

c) La Mutagénicité

L'aflatoxine B1 est la plus mutagène des quatre aflatoxines contaminants naturels. Des études réalisées sur des cellules humaines traitées par l'aflatoxine BI montrent un taux élevé d'aberration chromosomique principalement des cassures et échanges (Ong, 1975 et Worg *et al.*, 1976).

d) La Tératogénicité

D'après les expériences faites sur certaines espèces animales, l'aflatoxine B 1 montre un effet tératogène se traduisant par des résorptions, des malformations fœtales avec un retard du développement embryonnaire. De plus, on observe chez les femelles gestantes des nécroses hépatiques et rénales (OMS, 1979 et Schmidt F.R, Esser, 1985).

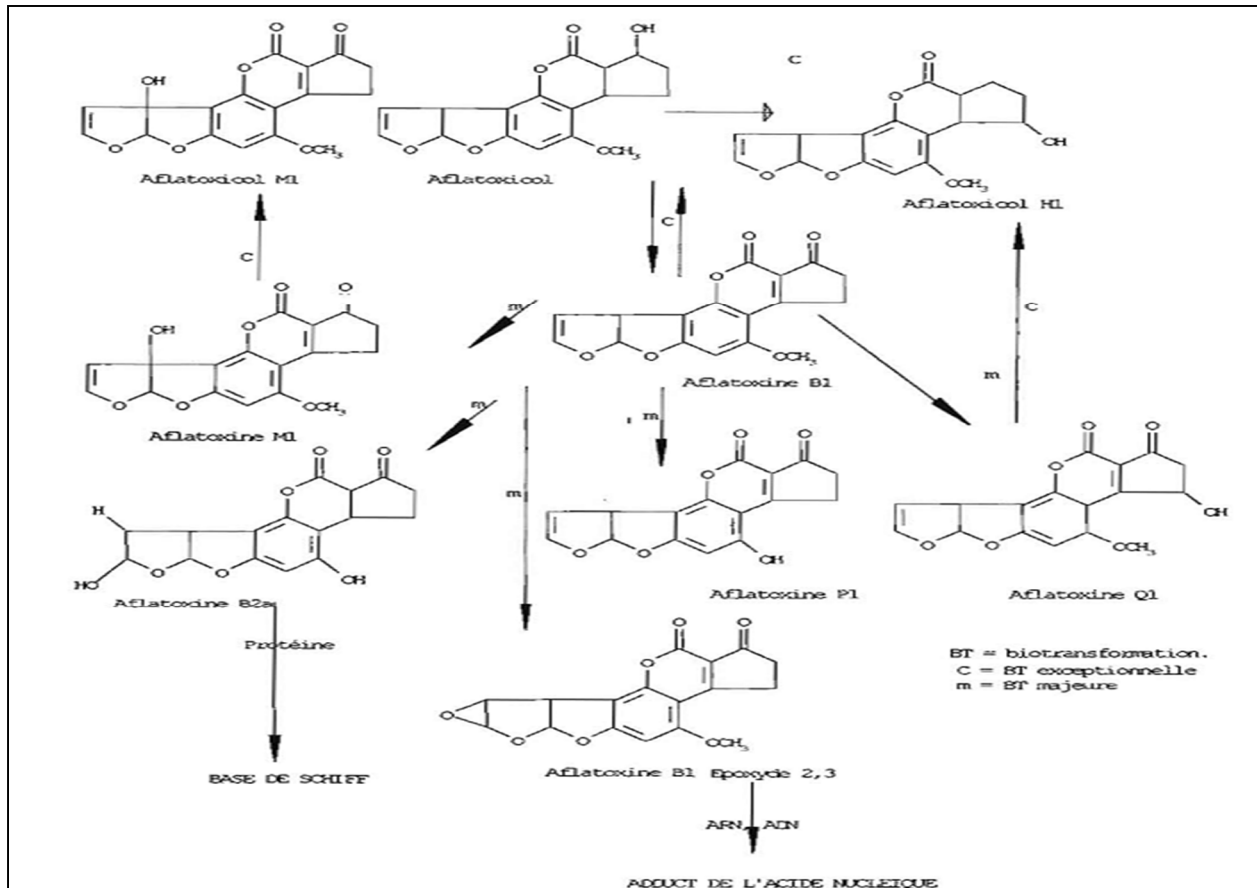


Figure 6 : Métabolisme hépatique de l'aflatoxine B1.

2.2-La plante *Lycium*

Le lycium ou lyciet en français et couramment appelé Goji, est un fruit originaire d'Asie, plus précisément d'une région comprise entre l'Asie mineur et l'Asie du sud-ouest. Connu depuis des millénaires et répertorié dans la médecine traditionnelle chinoise, ce fruit donnera santé et longévité, selon la citation extraite d'un ouvrage chinois intitulé la pharmacopée de l'empereur (Sharamon et Baginski., 2009). Le lyciet commun est largement répandu dans le monde, de l'Europe méridionale à l'Asie ; toutefois sa localité d'origine reste incertaine (Amagase et Farnsworth., 2011), longtemps prétendu originaire du nord-ouest de la Chine, certaines recherches montrent qu'il pourrait venir du bassin méditerranéen.

2.2.1-Plantation dans le monde

On recense actuellement 80 variétés de *Lycium* dont 51 en Amérique du Nord et 30 en Europe. Seules 7 espèces perdurent en Asie, bien que nous y trouvions les principales zones de culture de cette plante. Depuis une dizaine d'années, son succès auprès du public incite les agricultures de l'Amérique du Nord et de l'Australie à développer la culture de ce fruit (site

web.1). On compte au moins soixante-dix espèces du genre *Lycium* réparties dans le monde (zones vertes de la carte, figure7).

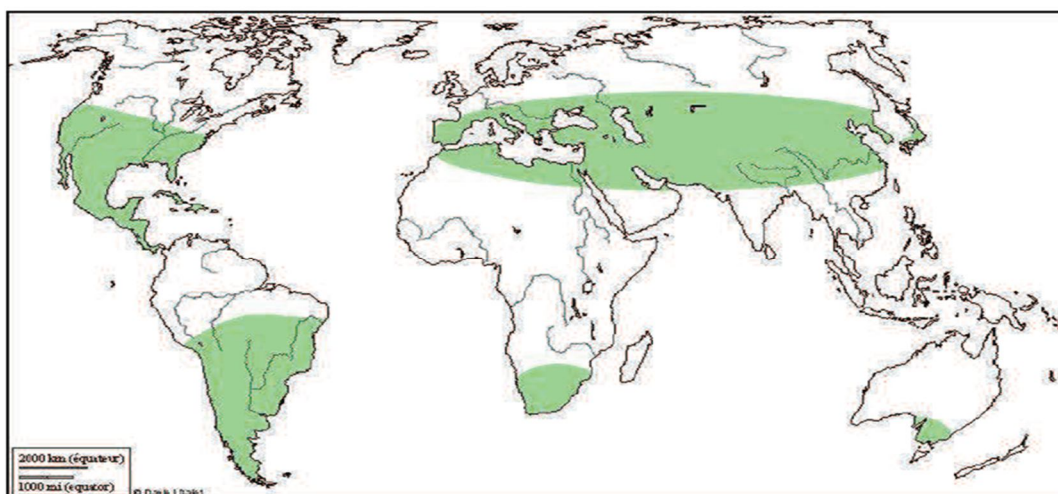


Figure 7 : Distribution du genre *Lycium* dans le monde (Fukuda *et al.*, 2001).

On trouve ces espèces dans les régions tempérées à subtropicales d'Amérique (Nord et Sud), d'Afrique du Sud, d'Eurasie et d'Australie. Selon une analyse phylogénétique moléculaire (analyse de séquences d'ADN) de l'ADN de chloroplastes d'espèces du genre *Lycium* en 2001, on distingue deux grands clades : l'un Comprenant les espèces d'Eurasie, Afrique méridionale et Australie, et l'autre celles d'Amérique du sud, Amérique du Nord et Pacifique. (Fukuda *et al.*, 2001 ; Amagase et Farnsworth,2011)

2.2.2-Ecologie et Culture

Le Lyciet est essentiellement retrouvé dans les haies, avoisinant les habitations. Sa répartition est très inégale (Bonnier, 1990). *Lycium* est naturalisé dans quasiment la totalité de la France ainsi que dans les Ardennes belges (site web. 2).



Figure 8 : cultures et récolte du Goji (Amagase et Farnsworth, 2011).

La culture du Goji est en pleine expansion depuis que les recherches scientifiques confirment son activité thérapeutique. Cette plante pousse préférentiellement dans les zones tempérées et ensoleillées, dans un sol alcalin et plutôt sec. La plante ne peut supporter le gel ainsi que de la température inférieure à 22°C. Les premières années de plantation ne donneront que de petite production. Ce n'est qu'au bout de 4 ans que les fruits peuvent être recueillis en quantité suffisante. La récolte a lieu durant la période estivale jusqu'en automne. Ces fruits sont ensuite séchés à l'ombre, puis exposés au soleil jusqu'à ce que l'extérieur du fruit soit dur et sec, tout en préservant une baie molle à l'intérieure (Amagase et Farnsworth, 2011).

2.2.3-Classification

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : *Solanales*

Famille : *Solanaceae*

Genre : *Lycium* (Cronquist, 1981).

2.2.4-Caractéristiques du genre *Lycium*

Le genre *Lycium* regroupe une centaine d'espèces herbacées et sarmenteuses, arbustes épineux et arbrisseaux. Leurs feuilles sont simples, alternes ou groupées, et courtement pétiolées. Le calice, plus petit que la corolle, comporte un tube relativement étroit qui se termine par cinq lobes étalés, en forme en cloche. Les fleurs sont petites, pourpres, violacées ou blanchâtres, isolées ou axillaires. Les cinq étamines sont fendues longitudinalement, de longueurs inégales, à anthères non conniventes. Le fruit est une baie globuleuse et charnue de couleur rouge à rouge-orangé, voire pourpre à maturité. Toutes les espèces du genre *Lycium* peuvent être retrouvées dans les haies mais également comme plantes ornementales (Delaveau, 2003 ; Bonnier, 1990 ; Botineau, 2010 ; Maitre, 2011).

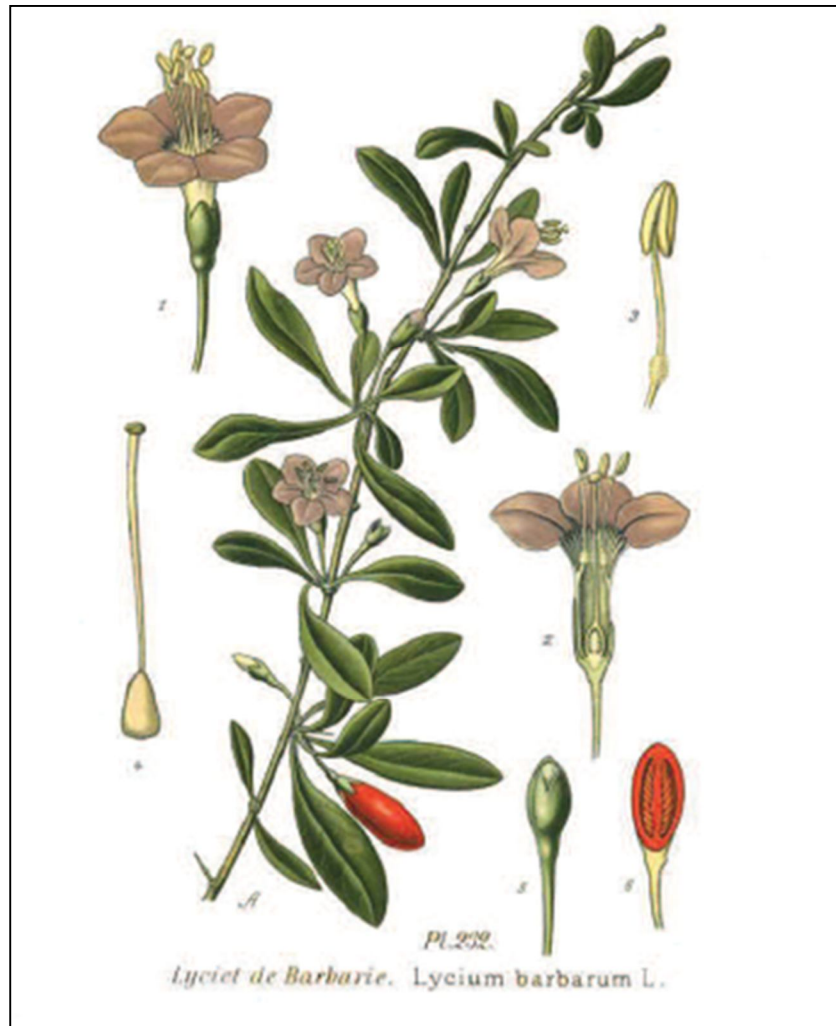


Figure 9 : planches botaniques de *Lycium* : (1). Fleur entière ; (2). Coupe longitudinale de la fleur ; (3). Etamine ; (4).Pistil ; (5).Bouton floral ; (6).Coupe longitudinale du fruit.

2.2.5- Principaux constituants

La baie de Goji (*lycium*) contient principalement Plusieurs polysacchrides uniques tels que le rhamnose, le xylose, le mannose, l'arabinose et le galactose, des caroténoïdes dont le bêta-carotène, la lutéine et la zéaxanthine, 19 acides aminés dont les 8 essentiels et 8 vitamines dont les vitamines B1, B2, B6, B12, E très rares dans les fruits et la vitamine C et A, 21 minéraux et oligo-éléments dont le germanium très rare dans les aliments, du fer, zinc, cuivre, sélénium, calcium, phosphore, magnésium, des Oméga 3 végétaux facilement assimilables, des fibres diététiques, de la bêta-sitostérol, de la physaline (Nutranews,1997). Elles contiennent également des acides phénoliques (acide chlorogénique, acide caféique) et des flavonoïdes (rutine) (Amagase, Farnswort, 2011).

2.2.6-Les Propriétés thérapeutiques de *lycium*

2.2.6.1-Inhibe la croissance des cancers

Une régression du cancer chez les patients avec un mélanome malin, un carcinome cellulaire rénal, un carcinome colorectal, un cancer du poumon, un carcinome nasopharynge et un Hydrothorax malin après le traitement d'un médicament anticancéreux combine a de *lycium*.

- Le taux de réponse des patients traités avec le médicament anticancéreux associé avec la plante médicinale était de 40,9 % contre 16,1 % pour les patients traités avec le seul médicament dans une période de rémission des patients traités par l'association également dure plus longtemps.
- Accroît la sensibilité à la radiothérapie et renforce le système immunitaire de patients cancéreux.
- inhibe la croissance de cellules humaines de Leucémie et la prolifération cellulaire donc stimule l'apoptose médiée par la P53 dans les cellules de Carcinome hépatocellulaire (Ieroux, 2014).

Une autre étude a examiné les effets d'un extrait liquide de *Lycium* sur la prolifération cellulaire et l'apoptose de cellules de carcinome hépatocellulaire de rats et/ou d'humains. Les résultats ont montré que l'extrait de *Lycium* inhibait la prolifération cellulaire et stimulait l'apoptose médiée par la P53 dans les cellules de carcinome hépatocellulaire (Chao *et al.*, 2006).

2.2.6.2-Renforcement du système immunitaire

Les glycopeptides de la plante de *lycium* est d'agir comme un stimulant du système immunitaire. Ils augmentent la réponse immunitaire. Ils favorisent notamment la fabrication et l'activation des lymphocytes T et des cellules naturel killer ainsi que la sécrétion, la prolifération et la différenciation des cytokines (hormones de régulation immunitaire) qui augmentent la réponse immunitaire qui aidant à lutter contre les maladies infectieuses. Les polysaccharides renforcent l'immunité également par leurs effets antioxydants. Les propriétés d'immunomodulation présentées par le Goji nous mènent directement à un autre bienfait de ce fruit : son action contre le cancer (Amagase, Farnsworth, 2011).

2.2.6.3-Effet régulateur du diabète de type 2, hypolipémiant et antihypertenseur

Chez des lapins présentant un diabète avec hyperlipémie, Luq(2004) un traitement des extraits de *lycium* pendant 10 jours pour réduire de manière significative la glycémie, le taux de cholestérol total et celui de triglycérides, tout en augmentant le taux de cholestérol HDL. À cela s'ajoute l'effet antioxydant du Goji, particulièrement souhaitable dans ce cas. Ces effets hypolipémiants et hypoglycémiant ont aussi été étudiés notamment par Zhao (2005), qui a trouvé une résistance spécifique pour l'insuline et une diminution de la concentration plasmatique de triglycérides et de cholestérol et de la glycémie postprandiale, et une perte de poids, chez des souris avec un diabète non insulino-dépendant traitées aux LbGP. (Wu *et al.*, 2006). Également une étude de Yu (2005) découvre que le *Lycium* module la pression sanguine, diminue les taux plasmatiques de triglycérides, de cholestérol total et de LDL-cholestérol et augmente celui de HDL-cholestérol chez les personnes âgées. La lutte contre les maladies cardiovasculaires et le diabète de type 2, par la diminution des facteurs de risque.

2.2.6.4-Effet neuroprotecteur dans les maladies neurodégénératives

Le peptide bêta-amyloïde (β -a) est néfaste pour le système nerveux. Par la formation de plaques, à l'origine de la maladie d'Alzheimer. L'effet neuroprotecteur des polysaccharides qui peuvent protéger les cellules neuronales contre la toxicité du β -a et contre l'apoptose. La toxicité du β -a par Le stress oxydatif, expliquent ce rôle neuroprotecteur. (Yu *et al.*, 2005).

2.2.6.5-Effet protecteur de la vision, contre le glaucome, la dégénérescence maculaire et la cataracte

Les glycopeptides jouent un rôle protecteur des cellules ganglionnaires de la rétine. Donc permet de diminuer la perte des fibres nerveuses en cas d'hypertension oculaire, puisqu'elle protégerait les fibres saines avoisinantes par la neutralisation des composés neurotoxiques (glutamate, oxyde nitrique) excrétés lors de la destruction de ces fibres. Certains caroténoïdes qui présentent en quantité importante dans la baie de Goji, comme la lutéine et la zéaxanthine constituent une source directe de nutriments et d'antioxydants pour les yeux et les protègent (Ieroux, 2014).

3- Matériel et Méthodes

3. Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur l'évaluation de l'effet hépato-protecteur de deux extraits d'une plante médicinale du genre *Lycium vis-à-vis* l'effet de la mycotoxine, Aflatoxine B1, produite par une souche d'*Aspergillus flavus*. Cette étude a été réalisée au sein du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'activité microbienne (**LaMyBAM**), Université des frères Mentouri, Constantine, et au niveau du Centre Hospitalo-universitaire (**CHU**) de Constantine.

3.1-Production d'Aflatoxine B1 par *Aspergillus flavus*

La souche d'*A. flavus* est fournie par le Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'activité microbienne (**LaMyBAM**). Sa réactivation est réalisée par des repiquages successifs sur gélose PDA (annexe 1) avec un temps d'incubation de 7 jours à 28°C.

3.1.1- Caractères culturels et morphologiques d'*A. flavus*

L'étude des caractères culturels d'*A. flavus* est basée essentiellement sur ses critères macroscopiques tels que la vitesse de croissance, la texture et la couleur de la colonie, la présence ou l'absence d'un pigment diffusible (Botton *et al.*, 1990). Cependant, l'étude des caractères morphologiques de la souche en question est faite par microscopie photonique en appliquant différentes techniques à savoir :

a) Observation par la technique de scotch

La technique de scotch consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch une fraction mycélienne à partir d'une culture jeune et de la coller sur une lame contenant quelques gouttes de lactophénol (Chabasse, 2002). Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements $\times 10$, $\times 40$ et $\times 100$.

b) Observation à l'état frais

Dans des conditions d'hygiène et d'asepsie, la préparation du matériel fongique pour l'observation microscopique à l'état frais est réalisée comme suit: un prélèvement soigneux d'un petit fragment mycélien à la marge du thalle, est réalisé à l'aide d'une anse en platine stérile. Ce fragment est transféré sur une lame, en lui ajoutant comme colorant du

lactophénol-bleu coton, l'observation microscopique est faite au grossissement $\times 10$, $\times 40$ et $\times 100$. Ce type d'identification est fondé 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).

3.1.2- Fermentation sur milieu Y.E.S

Le choix du milieu Yeast Extract Sucrose (YES) (annexe 1) comme milieu de fermentation, est basé sur les informations fournies par la littérature qui indiquent que c'est un milieu spécifique pour la production optimale des mycotoxines (Rojas *et al.*, 2005, Pamel *et al.*, 2010). La fermentation est réalisée dans des erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml du milieu de culture (YES) ajusté à pH 5,5 (Tuomi *et al.*, 2001). Deux disques, d'environ 5mm de diamètre, d'*A. flavus* sont inoculés dans les erlens contenant le milieu précédent. La préparation est incubée à 25 °C pendant 14 jours (Davis *et al.*, 1966).

3.1.3- Extraction des aflatoxines

Après 14 jours d'incubation, la biomasse formée est éliminée en filtrant la culture obtenue à travers du papier Wattman N° 01. Les 50 ml du filtrat obtenu sont additionnés à 100 ml de chloroforme, le mélange est rigoureusement agité pendant 10 min puis laissé décanter en utilisant une ampoule à décantation. Cette opération est répétée en additionnant successivement 50 et 30 ml du solvant à la phase aqueuse récupérée à chaque séparation. La phase chloroformique ainsi obtenue, est filtrée sur papier Wattman N° 01 puis concentrée par évaporation sous vide à l'aide d'un rotavapeur type (Heidolph laborota 4000 efficient) à 50°C, jusqu'à l'obtention d'un volume de 2 à 3 ml (indice d'une évaporation achevée). La figure 10 résume les différentes étapes d'extraction des mycotoxines.

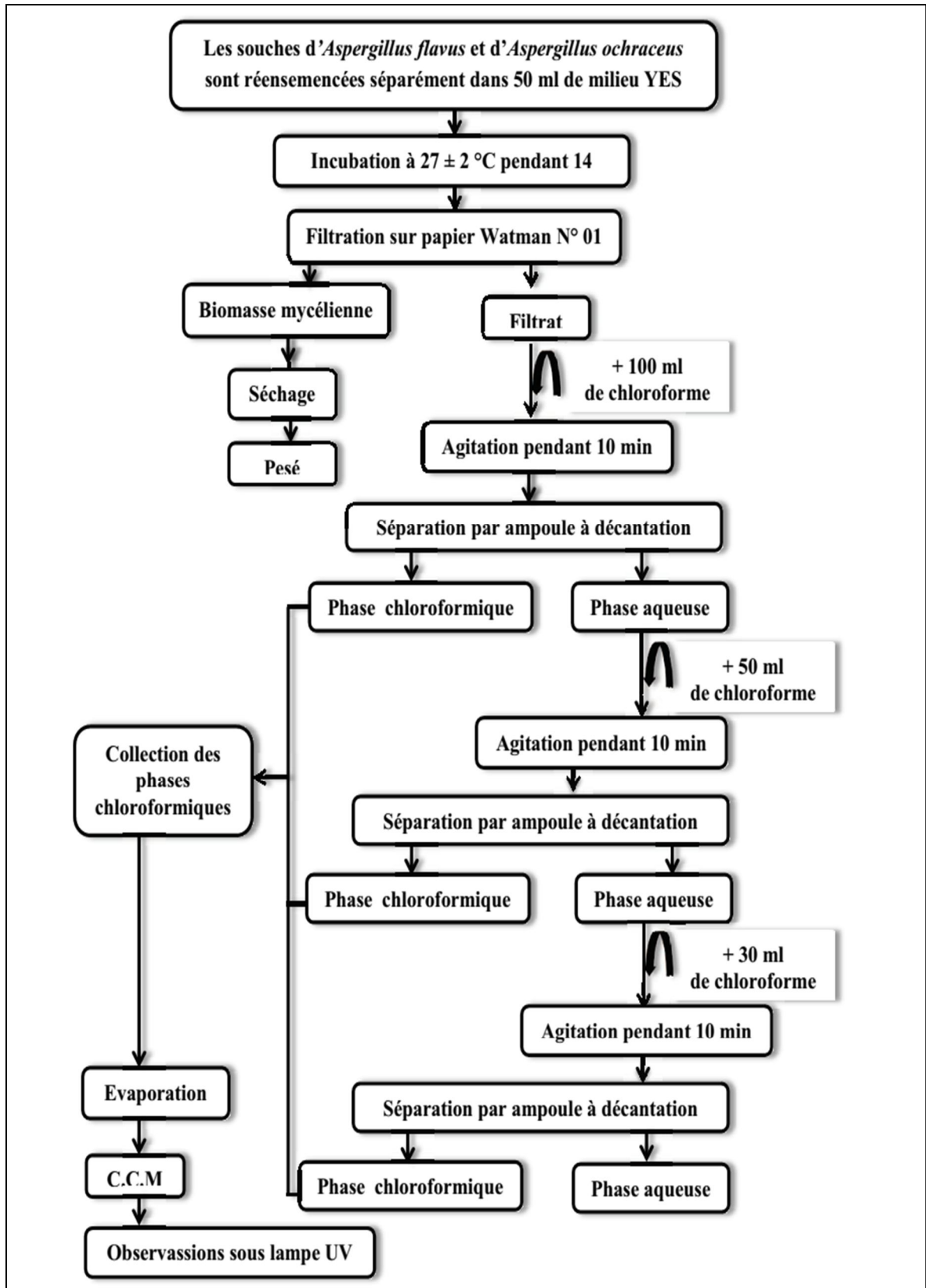


Figure 10 : Procédé d'extraction des mycotoxines (Multon, 1982).

3.1.4- Analyse par chromatographie sur couche mince (C.C.M)

3.1.4.1- Séparation chromatographique

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 silica gel (gel de silice 60 F254) sur laquelle est déposé un spot de 20 µl d'extrait chloroformique concentré et 5µl de solution standard d'aflatoxine B1 sur la même ligne de dépôt. La plaque est ensuite placée dans une cuve chromatographique et trempée dans un mélange de solvant d'élution constitué de toluène, d'acétate d'éthyle et d'acide formique de volume (5: 4:1 ml) respectivement (Multon, 1982). Après migration et évaporation du produit d'élution à sec à l'aide d'un évaporateur, la plaque est examinée sous UV à 365 nm (Nagy et Loutfy, 2002).

3.1.4.2- Calcul du rapport frontal (R_f)

Pour chaque spot, le rapport frontal est calculé par la formule ci-dessous, il est égal à la distance parcourue par le constituant divisé par la distance parcourue par le solvant.

$$R_f = d/D$$

d : Distance parcourue par le constituant

D : Distance parcourue par le front de l'éluant

Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la valeur du R_f ex : la qualité de l'adsorbant, la qualité du solvant, la concentration de l'échantillon, la saturation de la cuve.

3.2- Extraction de molécules bioactives à partir de la plante *lycium*

3.2.1- Matériel végétal

Le matériel végétal est fourni par le Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'activité microbienne (**LaMyBAM**), ce matériel comprend des feuilles du genre *lycium* récoltées à Djebel Chettaba, wilaya de Constantine (Figure11). Les feuilles, récoltées durant le mois de Mars 2016, sont identifiées par le Laboratoire de Génétique, Physiologie,

Biotechnologie végétal, en se référant au catalogue de la nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales (Quezel et Santa, 1962-1963).



Figure 11 : Le *Lycium* (A). dans son milieu naturel ; (B). Les feuilles de la plante.

3.2.2- Préparation des extraits et extraction des biomolécules

Les feuilles de *Lycium* ont été bien nettoyées des impuretés, séchées à température ambiante et à l'ombre pendant quelques jours, puis broyées à l'aide d'un mortier afin d'obtenir une poudre, cette dernière est pesée ($M=10g$) et est mise à macération dans un mélange hydroalcoolique (Méthanol / eau ; 80 / 20 ; V / V). Cette macération est répétée 2 fois avec renouvellement du solvant chaque 24 heure. Le produit obtenu a subi une filtration à travers du papier Wattman N°1. Le filtrat a subi des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par l'Ether de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle puis n-butanol. Les deux phases organiques ainsi obtenues, (acétate d'éthyle et butanol) sont concentrées à sec par évaporation rotative dans un rota vapeur-Heidolph, sous pression réduite, puis pesées et conservées pour utilisation ultérieure (figure12).

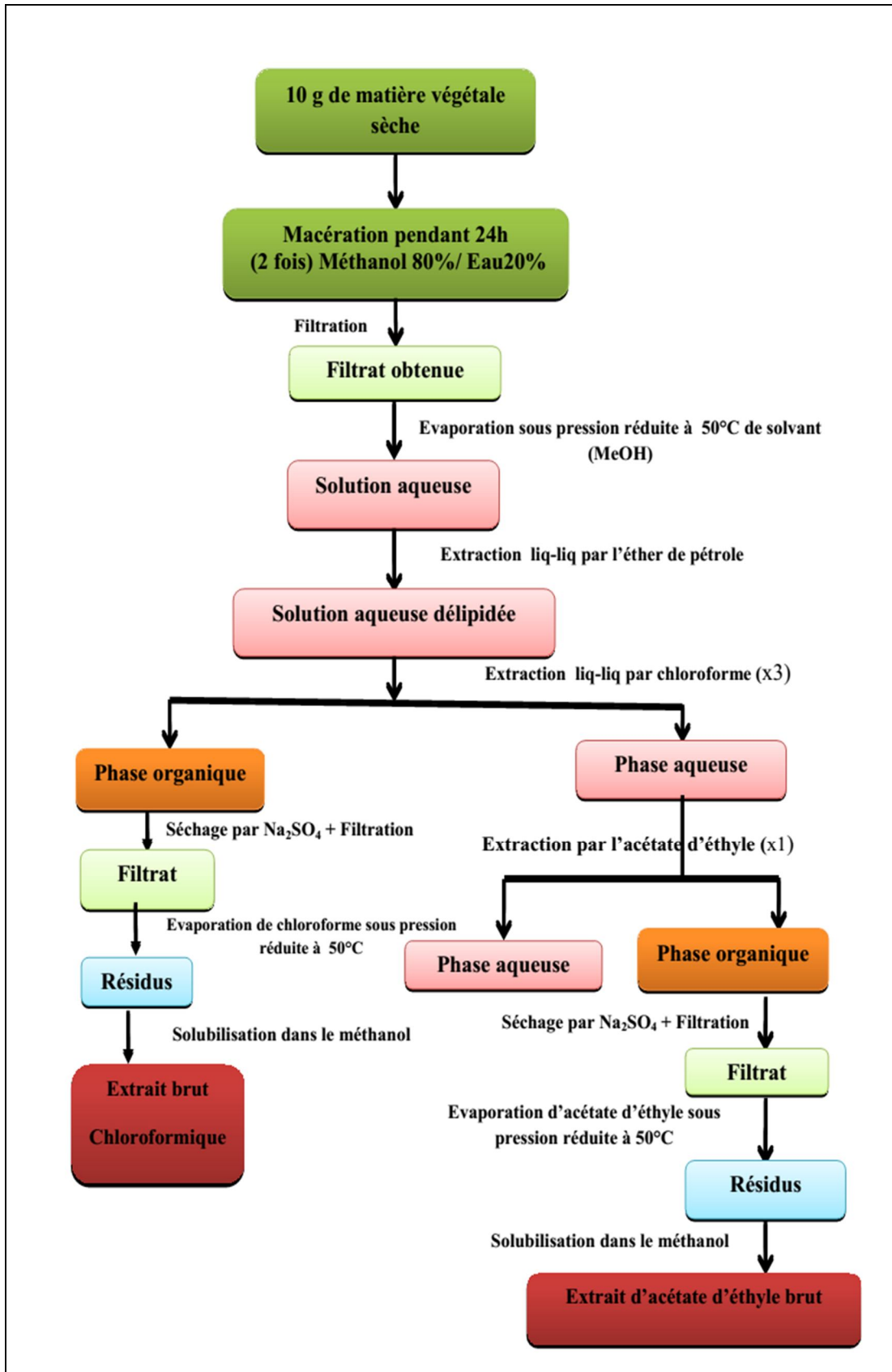


Figure 12 : le protocole d'extraction de différentes phases.

3.2.3- Calcul du rendement

Le rendement de la plante en extraits est le rapport entre le poids de l'extrait et le poids de la plante à traiter. Le rendement, exprimé en pourcentage, est calculé par la formule suivante:

$$R = PE/PA \times 100$$

Où

R= Rendement de l'extrait en pourcentage;

PE= Poids de l'extrait en gramme;

PA= Poids de la plante en gramme.

3.3- Étude *in vivo* de l'effet anti-hépatotoxique de *lycium*

3.3.1- Animaux et conditions d'hébergement

L'étude de l'effet anti-hépatotoxique de *lycium* a été réalisé avec un échantillon de 24 souris, males, de variété *Swiss albinos*, âgés de 1 mois et pesant 20 - 30 g, fournis par l'animalerie du Département de Biologie Animale de l'Université des frères Mentouri, Constantine. Les souris sont logées dans des cages en polyéthylène et tapissées d'une litière composée de copeaux de bois. Ils sont tabulés dans les conditions standards d'éclairage et de température (temps d'éclairage de 12 H par jour, température moyenne de 25°C). L'alimentation (orge, maïs, son, remoulage, soja, CMV : Complexe minéro-vitaminique) et l'eau sont fournies par le même département (El-Agamy, 2010, Oryan *et al.*, 2011).

3.3.2- Répartition des souris

Pour la détermination de l'effet protecteur de nos extraits, le protocole expérimental utilisé est celui décrit par Deabes *et al.*, (2012).

Les souris sont divisées en quatre lots constitués chacun de 06 souris. Les animaux sont traités par *per os* (gavage) pendant 7 jours successifs comme suit:

Lot 1 : Représente le témoin non traité.

Lot 2 : Représente le lot traité par l'Aflatoxine B1 (0.7 mg/kg de poids corporel).

Lot 3 : Représente le lot traité par l'ACT (500 mg/kg de poids corporel) 2 heures avant le gavage par l'aflatoxine B1 (0.7 mg/kg de poids corporel).

Lots 4 : Représente le lot traité par le BUT (500 mg/kg de poids corporel) 2 heures avant le gavage par aflatoxine B1 (0.7 mg/kg de poids corporel).

3.3.3- Administration

L'administration est réalisée sur des souris conscientes par gavage oral à l'aide d'une sonde rigide. La technique repose sur le principe suivant: bien tenir la souris pour qu'elle ne bouge pas lors de l'administration, puis lui faire avaler la sonde. Une fois le bout de la sonde arrive à son estomac la substance est injectée doucement (Figure13).

L'extrait a été repris avec de l'eau physiologique à un volume constant de 0.2 ml de solution par gramme de poids corporel des souris.



Figure 13 : Injection de l'extrait de *Lycium* par gavage oral.

3.3.4-Observations

Après l'administration de toxine et de l'extrait, les souris sont surveillées en permanence pendant 8 heures avec prise de notes sur les signes de toxicité apparents. Pour le reste de la période de l'expérience qui est de 7 jours les souris sont surveillées quotidiennement pour signaler s'il y a eu des morts ou des changements dans l'alimentation et la consommation d'eau ou encore des signes comportementaux. Le 8ème jour, toutes les souris restantes sont sacrifiées à la fin de l'étude.

3.3.5- Évolution du poids corporel des souris

L'évolution du poids des souris des différents lots est contrôlée dès le premier jour du traitement jusqu'à la fin de la période du traitement. Il est impératif d'ajuster les doses de traitement pour les lots chaque jour, selon le changement du poids afin de maintenir la même dose par kilogramme du poids corporel.

3.3.6- Prélèvement sanguin

La nuit du 7^{ème} jour, tous les animaux sont mis à jeûne, Le lendemain (8^{ème} jour), Le prélèvement du sang est effectué à l'aide d'un tube capillaire d'hématocrite, à travers le sinus rétro-orbital au niveau de la veine orbitale des rats anesthésiés par l'éther. Les échantillons du sang, d'environ 1ml, sont recueillis dans des tubes contenant l'héparine utilisée pour les analyses biochimiques. Les tubes à héparines sont centrifugés à 3000tr/10min et le sérum obtenu est conservé à une température de -15 à -20°C jusqu'à son utilisation (Ben-Romdhane *et al.*, 2003).

3.3.7- Sacrifice des animaux

À la fin de la période du traitement (8^{ème} jour), les animaux sont mis à jeûne vingt-quatre heures avant les manipulations. Après le prélèvement sanguin, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale, puis l'autopsie a été effectuée pour prélever le foie. Les foies ont été rincés avec l'eau physiologique froide, séchés avec du papier filtre et pesés.

3.3.6- Détermination du bilan hépatique

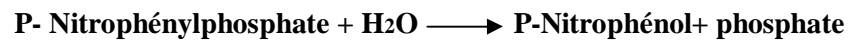
Le bilan hépatique effectué consiste en un dosage dans le sérum des principaux marqueurs moléculaires de lésions hépatiques, qui sont les transaminases, ASAT qu'il a une distribution beaucoup plus large, dans le foie, le cœur, les muscles squelettiques, les reins, son dosage sanguin estime la partie cytoplasmique de cette enzyme, soit environ 10% du total (Imbert *et al.*, 2003) et ALAT qui est présente essentiellement dans les hépatocytes, le cytoplasme, et accessoirement dans les muscles et le rein. Il n'y a pas d'iso-enzymes spécifiques d'un tissu donné. Sa demi-vie d'élimination plasmatique est d'environ 45 heures (Dufour *et al.*, 2000). Aussi, les phosphatases alcalines (PAL) qui est le marqueur habituel de cholestase (Gopal *et al.*, 2000), qui est définie par l'atteinte des mécanismes d'excrétion biliaire. Les phosphatases alcalines augmentent en cas de cholestase, mais également au cours de la croissance, de la grossesse et en cas de lésions osseuses (Gopal *et al.*, 2000, Pratt *et al.*, 2005).

➤ Principe de la réaction des transaminases

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

➤ **Principe de phosphatase alcaline**

L'activité enzymatique de la PAL est déterminée selon la réaction suivante (Wenger *et al.*, 1984, Rosalki, 2005).



4- Résultats et Discussion

4. Résultats et discussion

Ce travail est basé sur l'étude de l'effet anti-hepatotoxique de la plante médicinale du genre *Lycium* vis-à-vis de l'Aflatoxine B1, une mycotoxine produite par une souche d'*Aspergillus flavus*.

4.1-Production d'Aflatoxine B1 par *Aspergillus flavus*

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

4.1.1-Caractères cultureux et morphologiques d'*A. flavus*

L'étude macroscopique d'*A. flavus* est réalisée à l'œil nu après 7 jours d'incubation, sur gélose PDA à température optimal ($25\pm 2^\circ\text{C}$). En effet, *A. flavus* se développe rapidement (2 à 3 jours), sur cette gélose, la forme des colonies est duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaune, puis vert-jaune. Le revers incolore. Ces observations sont rassemblées dans le tableau 2 et la figure 14 ci-dessous.

Tableau 2 : Caractères macroscopiques d'*Aspergillus flavus*.

Vitesse de Croissance	Délai de culture	Température d'incubation	Aspect
rapide (48h-72h)	2 à 3 jours	28°C	Recto (surface) : Colonies duveteuses à poudreuses, de couleur verte-jaunâtre. Verso (revers) : Incolore

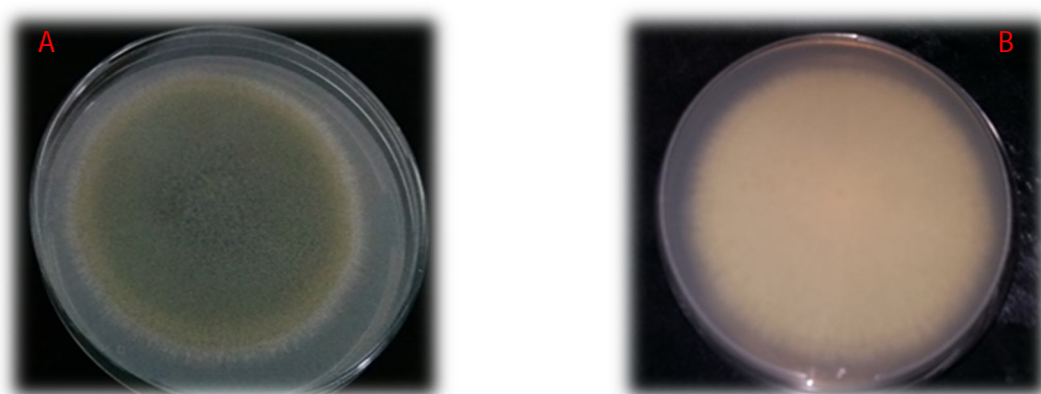


Figure 14 : Aspect des colonies d'*A. flavus* sur milieu PDA: (A). face ;(B). Revers.

Par ailleurs, l'étude microscopique de la souche en question, a permis d'observer un mycélium cloisonné, une tête aspergillaire constituée d'une vésicule sphérique, sur laquelle sont formées les phialides portés sur des métules (tête bisériée), chaque phialide produit des

conidies globuleuses à subglobuleuses, vert pâle, échinulées. Les têtes aspergillaires sont portées sur des conidiophores hyalin, (figure15). Toutes ces observations, à savoir ; macroscopiques et microscopiques, corroborent ceux de Tabuc, 2007, qui indiquent qu'elles appartiennent à *Aspergillus flavus*.

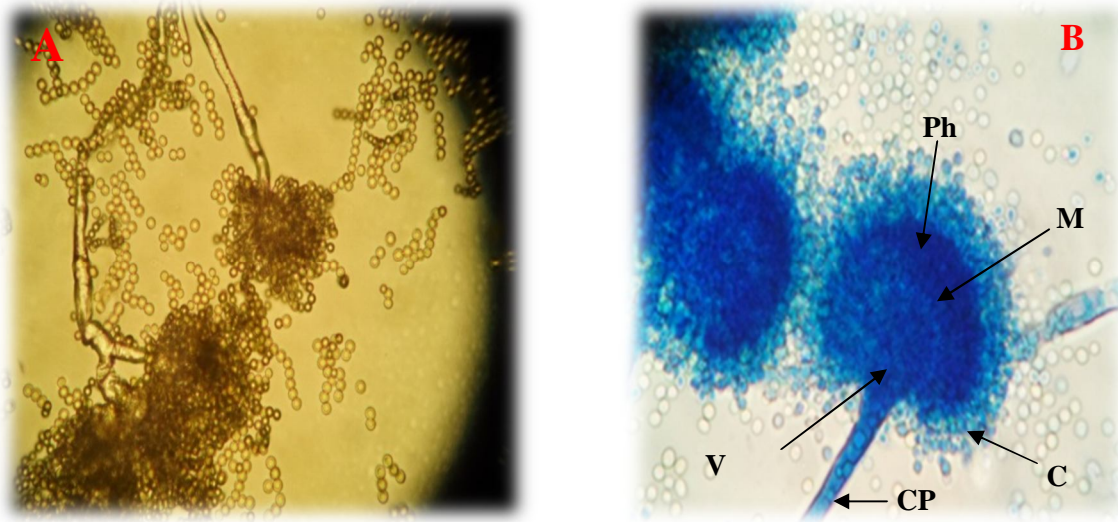


Figure 15 : Aspect microscopique d'*Aspergillus flavus* sous microscope optique : (A). à grossissement x40, (B). à grossissement x 100.C: conidies ; CP: conidiophore ; V: vésicule ; M: mételle ; Ph:phialide.

4.2-Fermentation sur milieu YES

Après 14 jours d'incubation dans l'obscurité à 25°C, un bon développement de la souche a été observé sur le milieu YES, cela est confirmé par la mesure du poids sec après filtration et séchage qui est estimés à 69.2g/l. Selon la littérature consultée, le milieu YES favorise la métabolisation secondaire et induit les réactions anabolisantes conduisant à la production des mycotoxines. Il est aussi adapté pour la production des niveaux plus élevés d'aflatoxine que les d'autres médias (Davis *et al.*, 1966). Dans une autre étude, Gqaleni *et al.*, 1997 ont montré que, sur milieu YES, à une aw de 0,9, *A. flavus* se développe dès 20°C, et la production d'aflatoxines se fait à partir de 25°C et est optimale à 30°C. La toxinogénèse dépend également de la nature chimique du substrat dans ou sur lequel se développe l'espèce fongique.

4.2.1-Extraction des aflatoxines

4.2.1.1-Filtration

À la fin de la période de fermentation (14 jours), la biomasse formée est éliminée en filtrant la culture obtenue à travers du papier filtre type Wattman N° 01 (figure16).

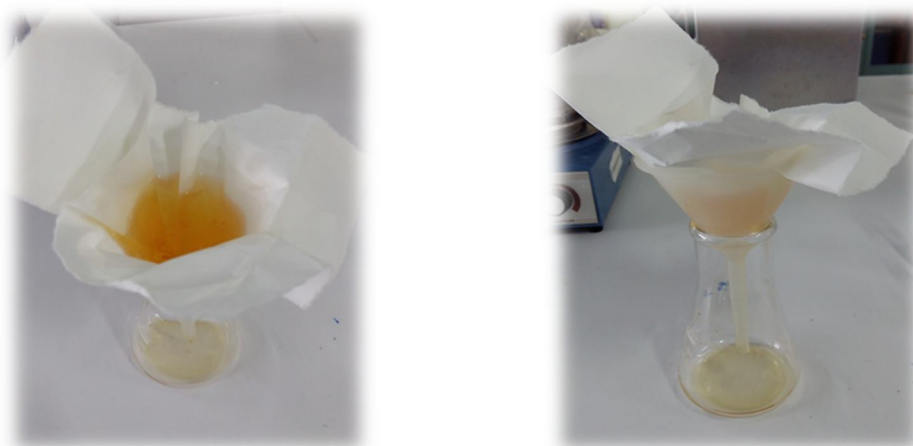


Figure 16 : Filtration de la culture obtenue sur papier wattman N° 01.

4.2.1.2-Extraction

Le mélange (chloroforme et filtrat) est bien agité à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 30 minutes. La séparation de la phase aqueuse de celle chloroformique est obtenue après avoir laissé le tout se décanter dans une ampoule à décantation (figure17) ; une aqueuse en haut de l'ampoule et l'autre chloroformique en dessous de celle-ci.

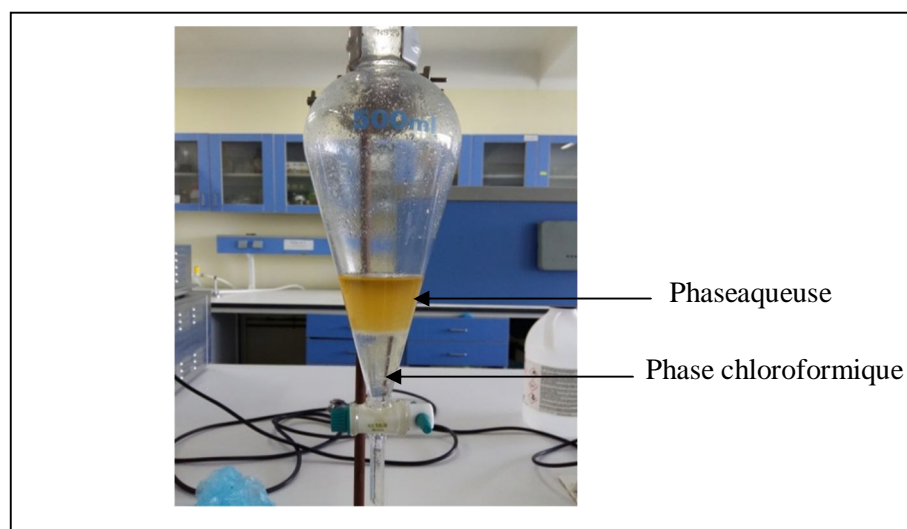


Figure 17 : Décantation dans une ampoule à décanter.

L'extraction d'aflatoxine a été réalisée par le chloroforme où l'aflatoxine est récupérée à partir de la phase chloroformique. Après la concentration par évaporation au Rotavapeur à 50°C avec une légère rotation (150 rpm), ceci a permis d'obtenir l'extrait recherché qui se présente sous forme d'un film de couleur vert sur la paroi du petit récipient (figure18).

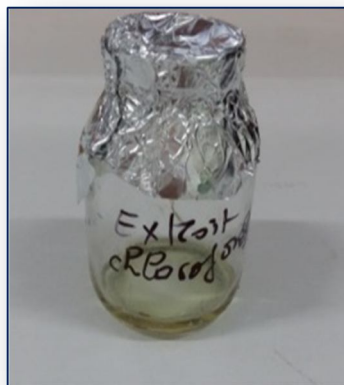


Figure 18 : Extrait chloroformique après concentration.

4.2.1.3-Séparation par chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince a permis de séparer plusieurs spots, apparus sous formes de taches colorées après révélation sous lumière UV à une longueur d'onde de 365 nm (Nagy et Loutfy, 2002). Cette technique a montré que l'extrait chloroformique contient plusieurs molécules, avec différents rapports frontaux. Après comparaison avec le spot obtenu par la solution standard d'aflatoxine B1 (pure), il s'est avéré que notre extrait comprend l'AFT B1 qui donne une fluorescence bleue et un $R_f=0.38$ (figure 19). Les aflatoxines sont des molécules de faible poids moléculaire (312 à 330), très peu solubles dans l'eau, insolubles dans les solvants non polaires. Très solubles dans les solvants organiques moyennement polaires (chloroforme et méthanol), elles sont assez facilement extraites. Sous lumière ultraviolette (UV longs), elles sont fluorescentes (bleue pour les AFB "blue" et verte pour les AFG "green", l'AFM1 ayant une fluorescence bleu-mauve) (Asao et al, 1965). D'après l'étude faite par Dorner et ses collaborateurs, 1984, l'*Aspergillus flavus* produit principalement l'aflatoxine B1 et B2 alors qu'il ne produit habituellement ni d'aflatoxine G1 ou G2.

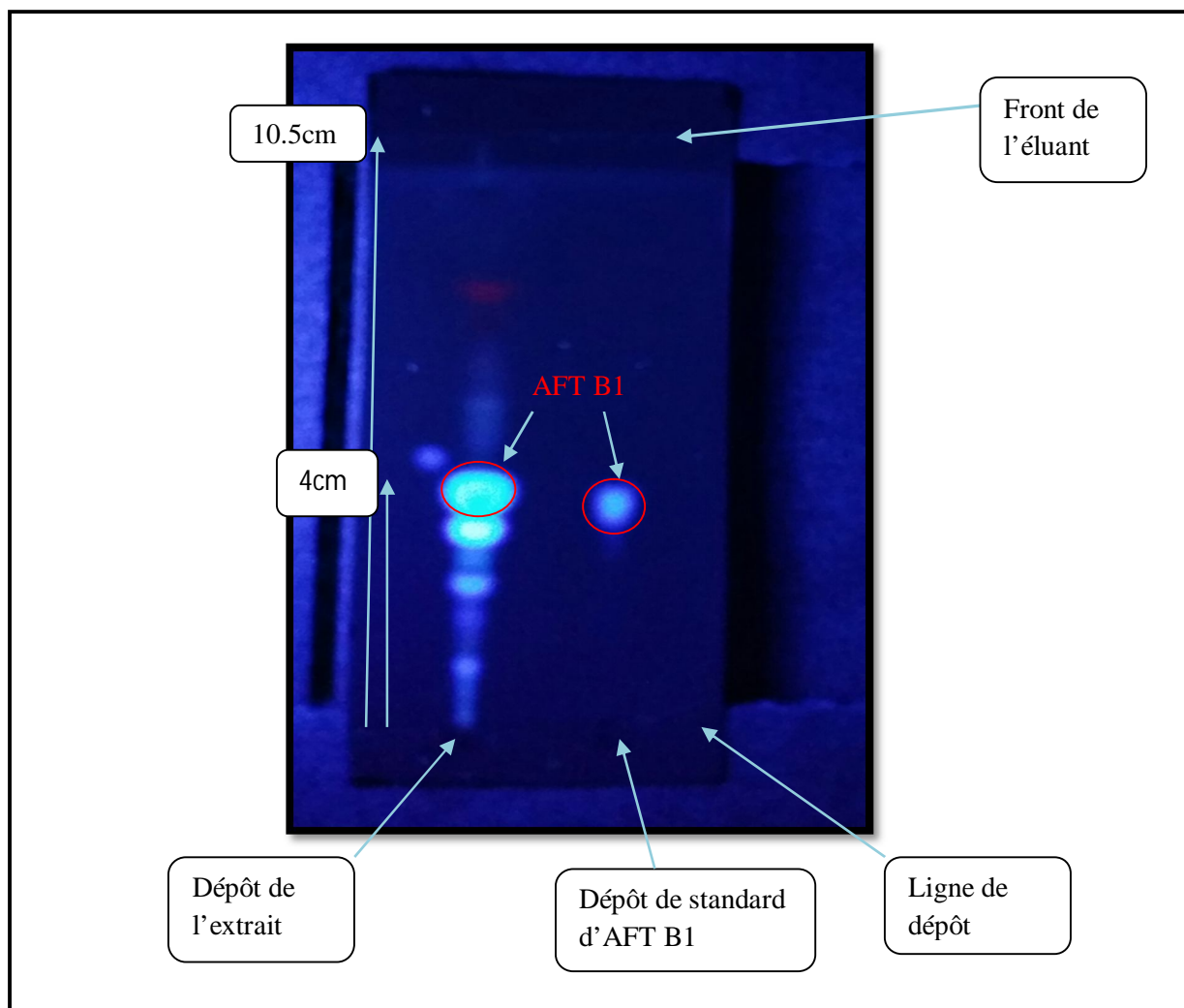


Figure 19 : Chromatographie sur couche mince présentant les spots d'AFT B1 produite par *A. flavus* après 14 jours de fermentation. Séparée sur gel de silice par l'éluant toluène, acétate d'éthyle et l'acide formique de volume (5 : 4 : 1) respectivement sous lumière UV 365.

4.3- Extraction de molécules bioactives à partir de la plante *lycium*

Après le nettoyage, séchage et broyage des feuilles de *Lycium*, la matière végétale obtenue est mise à macération pendant 24h (2 fois) suivie d'une filtration. La solution obtenue, a subi des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante, deux phases sont obtenues à savoir : une phase aqueuse inférieure et une phase organique supérieure (de l'éther de pétrole). La phase organique, ainsi obtenue, a subi une série d'extraction par des solvants de différentes polarités (chloroforme, l'acétate d'éthyle puis n-butanol) donnant naissance à d'autres phases organiques selon le solvant utilisé (figures 20.21.22).

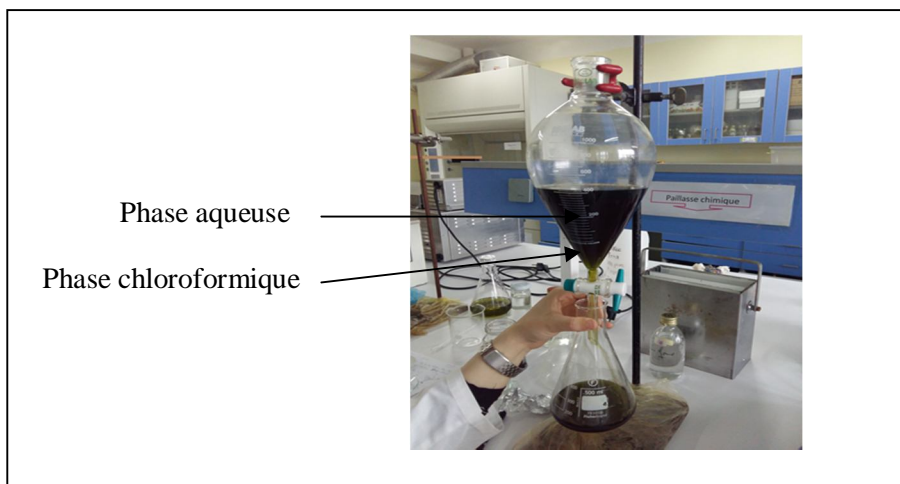


Figure 20 : Extrait à partir des feuilles de *Lycium* dans la phase chloroformique.

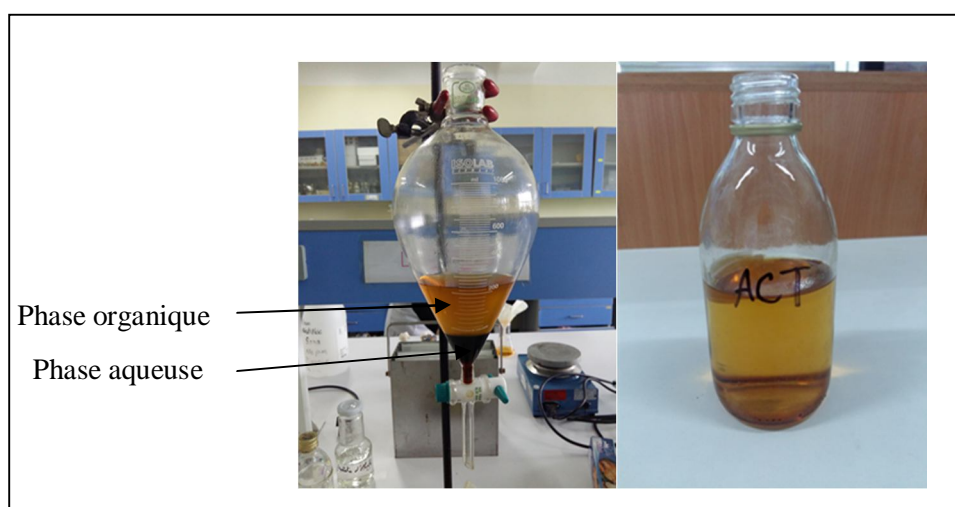


Figure 21 : Extrait à partir des feuilles de *Lycium* dans la phase d'acétate d'éthyle.

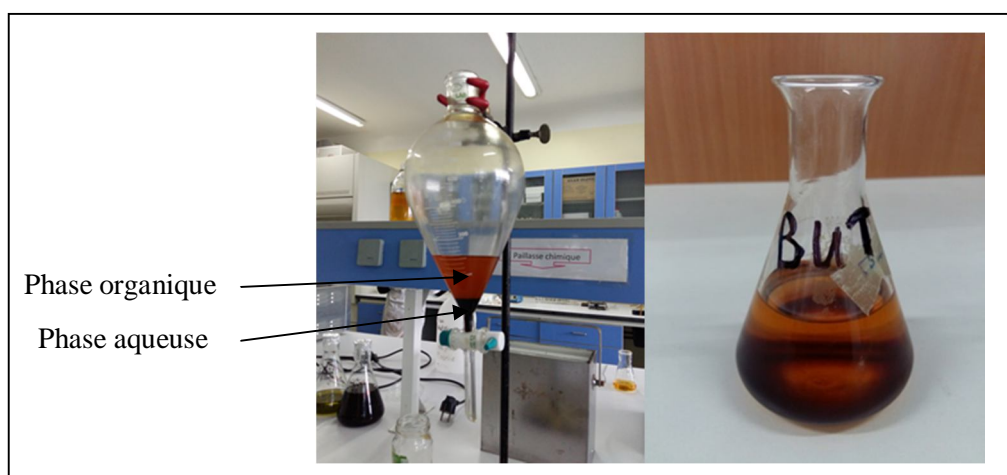


Figure 22 : Extrait à partir des feuilles de *Lycium* dans la phase butanolique.

Après évaporation des extraits obtenus, le calcul du rendement en extrait de plante a montré que l'extrait butanolique représente le rendement le plus élevé par rapport à l'extrait d'acétate d'éthyle (figure23).

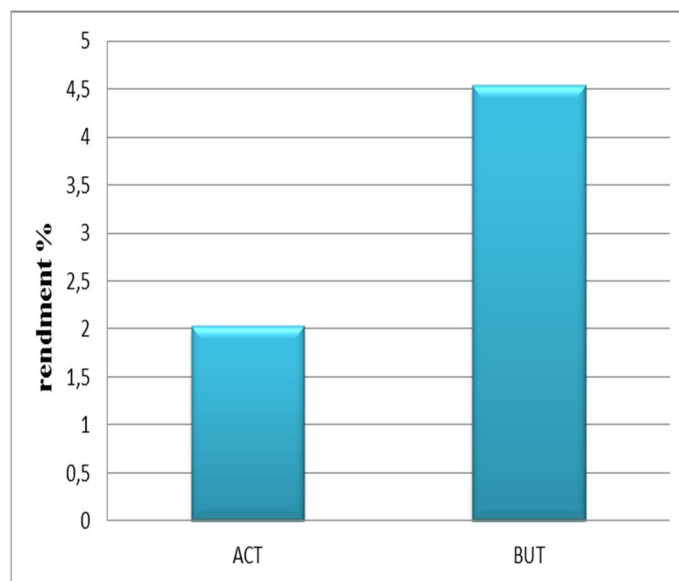


Figure 23 : Histogramme rendement de l'extrait.

4.4-Étude *in vivo* de l'effet anti-hépatotoxique de *lycium*

Cette étude a été consacrée à l'évaluation *in vivo* de l'effet anti-hepatotoxique de l'extrait (ACT, BUT) de *lycium*, en utilisant des souris males de type *Swiss albinos*, après les avoir exposées à l'Aflatoxine B1 (0.7 mg/kg) par voie orale. Plusieurs paramètres sont pris en considération en l'occurrence: la variation du poids corporel de l'animal, du poids de foie et l'activité enzymatique des enzymes hépatiques.

4.4.1-Signes de toxicité

En comparaison avec les témoins, et après une semaine de l'application, une mortalité a été observée chez les souris males traités par l'AFB1, accompagnée par la présence de signes physiques de toxicité tel que: perte d'appétit, faiblesse, respiration laborieuse, perte d'équilibre, accélération du rythme cardiaque, convulsion, paralysie totale, et coma. Ces signes sont dus, vraisemblablement, à l'intoxication par l'Aflatoxine B1. En revanche, Les souris traités par les extraits ACT et BUT aucun signes d'intoxication n'a été observé. Aussi l'intoxication aigüe par les aflatoxines peut se manifester par un malaise, une perte de l'appétit puis un ralentissement du gain de poids (Gita, 2005).

L'Aflatoxicose aiguë, associée à des doses extrêmement élevées de l'aflatoxine, est caractérisé par des hémorragies, une destruction aiguë du foie et un taux élevé de mortalité chez les rats. Les premiers symptômes d'exposition d'infection à haut niveau à l'aflatoxine comprennent la diminution de l'appétit, un malaise. L'exposition à des concentrations élevées d'aflatoxine B1 est associée à un risque accru de développer le carcinome hépatocellulaire, ou cancer du foie, ainsi que les troubles de la fonction immunitaire et la malnutrition et une croissance ralentie (Garcia et Cotty, 2010).

4.4.2-Poids corporel

L'évolution du poids corporel des souris au cours de la période de traitement est suivi chaque 24heures. En effet, le poids corporel du groupe traité par l'AFB1 a connu une diminution importante entre le 1^{er} et le 7^{ème} jour. Par contre, les témoins ont présenté une évolution normale de leurs poids, évaluée à 10.24 % par rapport au premier jour, alors que le gain du poids est sensiblement remarquable. Enfin, les deux lots traités par les extraits ACT et BUT, traduisant une légère récupération de poids, cette augmentation n'est pas importante par rapport au poids initial (figure24).

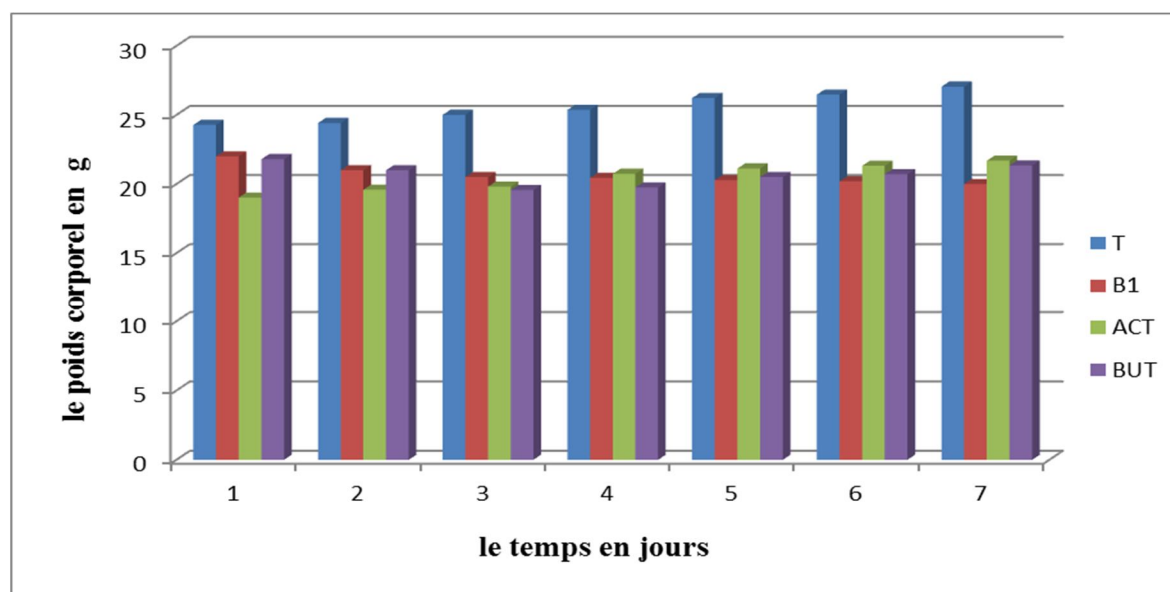


Figure 24 : Évolution du poids des souris témoins et traités durant une semaine.

Le changement du poids corporel au cours de 7 jours est utilisé comme un indicateur des effets indésirables des composés chimiques (Hilaly *et al.* 2004). La perte du poids est corrélée à l'état physiologique de l'animal, et le mode d'administration, Cette réduction du poids peut être expliquée par une réduction de la consommation des aliments, mais aussi par les possibilités d'interactions dose/absorption et par la diminution de la quantité de nourriture

absorbée. Ces résultats sont en accord à ceux obtenus par Galtier *et al*, 1974, qui révèlent que l'intoxication du rat par l'AFB1 entraîne une altération de la croissance pondérale, la persistance de l'effet toxique et probablement la rémanence de la toxine dans l'organisme. Ces résultats sont aussi similaires à ceux cités par Bodin *et al.*, 1975 ; Hatey, 1977 et Molinie, 2004. En ce qui concerne les rats intoxiqués par l'AFB1, Hanak, 2002 avait démontré l'existence d'un ralentissement de la croissance, voire une toxicose hépatique chez les animaux d'élevage. D'un autre côté, les études de Pohland *et al*, 1992 ; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2002; Pfohl-Leszkowicz et Castegnaro, 1999 ont montré l'effet délétère des mycotoxines sur différents organes tels que, les intestins, ceci peut conduire à une mauvaise rétention des éléments nutritifs au niveau de l'épithélium intestinal et par conséquent une diminution du poids corporel.

4.4.3-Poids du foie

Le deuxième constat de l'analyse de nos résultats révèle que le groupe des toxines fongiques (AFB1) a présenté des valeurs prééminentes concernant le poids du foie. Le poids du foie des souris traités par AFB1 montre une diminution par rapport au poids du foie des souris témoins. Cette diminution (figure 25), est due probablement à une intoxication par l'AFB1 consommée durant le traitement, qui peut être expliquée par la destruction des cellules hépatiques (hépatite nécrosante)

Chez les souris traités par extrait ACT et BUT utilisé comme un hépato-protecteur, on remarque que le poids du foie est légèrement supérieur par rapport au lot traité par l'AFB1. Cette constatation est peut être due à l'effet du traitement appliqué qui aide à réparer ou préserver les lésions des cellules du foie induites et facilite le rétablissement d'une nécrose hépatique.

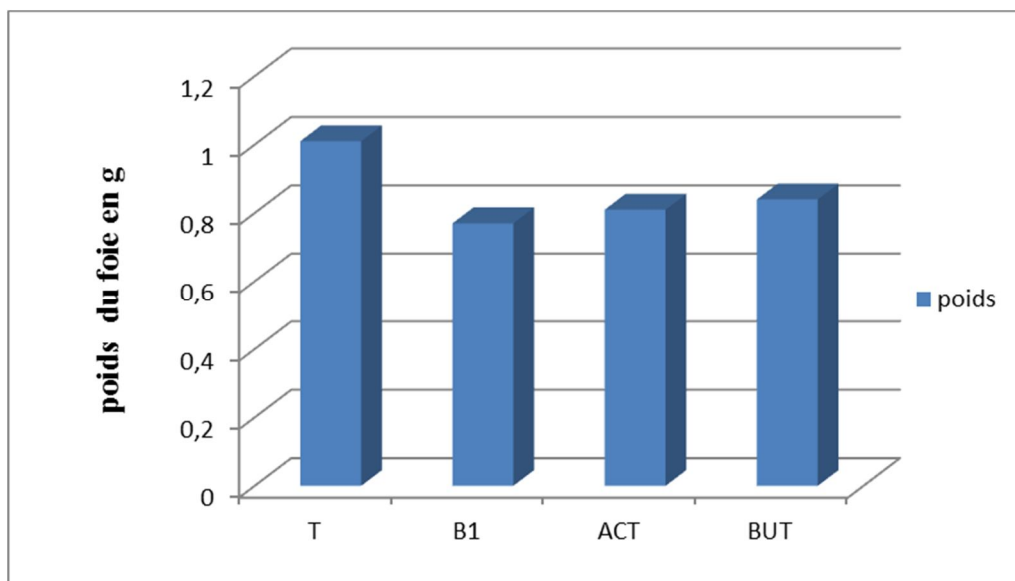


Figure 25 : Effet de l'AFB1 sur le poids des foies des souris traitées.

Dans le cas de l'AFB1 l'intoxication aigüe peut provoquer des signes importants de lésions du foie pouvant induire des congestions voir même des hémorragies pouvant être à l'origine d'encéphalopathies et d'œdèmes pouvant entraîner la mort de l'animal sous l'action d'une hépatomégalie au bout de quelques heures voir quelques jours. Dans le cas le plus fréquent d'Aflatoxicose chronique, le foie reste la principale cible (Gita, 2005). L'action de l'AFB1 peut prendre d'autres proportions une fois ingérée. En effet l'aflatoxine B1 est dégradée et les substances qui en résultent sont parfois plus toxiques que la mycotoxine ingérée (Yiannikouris et Jouany, 2002).

4.4.4-Dosage de transaminase

Les transaminases sont des marqueurs biologiques d'une atteinte hépatique et de la nécrose hépatocytaire. Elles sont de nature enzymatique, dont le rôle consiste à transférer un groupe amine lors des nombreux processus chimiques qui se déroulent au niveau hépatique. La localisation de ces hormones est surtout hépatique (dont ils reflètent la fonction de dégradation et d'épuration), mais aussi musculaires notamment le muscle cardiaque qui est le plus riche en ASAT.

Nos résultats montrent une augmentation significative des concentrations moyennes (hypertransaminasémie) des ALAT et ASAT chez les souris intoxiquée par l'AFB1 par rapport aux lots de souris témoins (figure25). En effet, le pourcentage de l'augmentation est de l'ordre de 57.55% pour l'ALAT et de 69.59% pour l'ASAT en comparaison avec les animaux témoins.

Cette augmentation des transaminases pourrait être expliquée par une cytolysse hépatique comme il a été préconisé par Reynier, 2011.

Ces résultats sont en accord à ceux de Broska *et al.*, 2003 et Nemmiche *et al.*, 2007. En effet ces auteurs ont signalés une augmentation significative des transaminases chez les lots de rats intoxiqués au cadmium suite à une atteinte hépatique

De plus, l'élévation des enzymes hépatiques, l'aspartate amino transférane et l'alanine amino transférane sont généralement associés à une blessure du foie ou une inflammation des cellules hépatiques (Cheng et Kong ,2011). L'AFB1 est une source d'hypertrophie hépatique, ce qui confirme l'hépatotoxicité connue de cette mycotoxine (Tung et Hamilton, 1973; Moreau, 1994 ; Denli et Okan, 2006).Etant donné que la cytolysse hépatique est l'un des principaux et premiers signes de l'hépatotoxicité, nous sommes partis du principe que les taux plasmatiques des transaminases hépatiques ASAT et ALAT, devraient forcément augmenter sous l'effet de toxine B1 (Dorosz, 2003).

Dans ce travail, le taux de l'ASAT des animaux traités par l'extrait ACT et BUT, est 9.91%, 2.71%, respectivement. Tandis que le taux de l'ALAT des animaux traités par l'extrait ACT et BUT est 35.56% pour les deux extraits. Ces taux sont inférieur à ceux des ASAT et ALAT des animaux traités par AFB1 et proches à ceux des souris témoins.

L'effet hépato-protecteur des extraits ACT et BUT de *lycium* est justifié par le taux normal de l'ALAT et l'ASAT. Cette propriété de *lycium* s'explique par sa richesse en composant chimique tels que des peptides cyclique, un glycoside dérivé du tryptophane, des alcaloïdes, des acides phénolique et des flavonoïdes (Quercétine-3-O-rutinoside, Kaempherol-3-O-rutinoside, acide caféique, acide vanillique et d'autres)(Maitre,2011) et les composés particuliers au *lycium* à savoir: les polysaccharides qui sont des glycoprotéines formées par un hétéroside et conjugué avec une chaîne polypeptidique.

Il est important de signaler que peu de travaux sont réalisés sur les feuilles de *lycium*, la majorité des travaux est faite sur la *baie de goji* (fruit) (Luq *et al.*, 2004).

Le *lycium* est utilisé pour nourrir le foie, il bloque les dégâts des toxines, en inhibant la peroxydation lipidique des cellules du foie et empêche la pénétration des toxines en compétition pour les mêmes sites récepteurs sur les membranes cellulaires, plusieurs études ont montré l'effet hepato-protecteur des polysaccharides de *lycium*(LP) via son action antioxydante (Xiaq *et al.*, 2012)

Le stress oxydatif hépatique résulte par la formation d'espèces réactives de l'oxygène et par la réduction de la capacité antioxydante, entraînant par conséquent une peroxydation lipidique, cette dernière est elle-même responsable de désordre des cellules hépatiques. Dans une étude faite sur des rats sains sans traitement, des rats traités par de l'éthanol et un groupe de rats alcoolisé, supplémenté en polysaccharides de *lycium*(LP), les résultats obtenus, confirme la présence d'un stress oxydatif et d'une augmentation de la peroxydation lipidique pour les rats sous éthanol, par rapport au groupe traité. L'activité des enzymes antioxydant diminue et le taux de MDA augmente dans le groupe sous alcool, par apport au groupe traité par les LP, ces résultats reflètent l'action protectrice de ce dernier sur le stress oxydatif dans le foie (Cheng et Kong, 2011)

Les concentrations sériques de ces enzymes sont moins importantes dans le groupe supplémenté en LP, ces résultats confirment le rôle des LP dans la prévention des dommages hépatique (Cheng et Kong, 2011), les LP ont montré des effets préventifs sur les dommages induits sur le foie par alimentation riche en graisse (Wu *et al.*, 2010). Une action supplémentaire des LP dans la protection du foie a été démontrée dans une autre étude portant sur l'inhibition de l'expression de l'enzyme cytochrome p405des hépatocytes (Guet *al.*, 2007 ; Xiaq *et al.*,2012).

4.4.5-Dosage de phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline permet de dépister toute pathologie se rapportant à l'os et au foie, son dosage est spécifique aux intoxications hépatiques et celle des voies biliaires. (Millan., 2005).

L'Augmentation de taux de l'activité PAL est un signe d'atteinte des voie biliaires observé au cours des hépatites, des cholestase ou des tumeurs comme elle peut être un symptôme de diverse maladie de l'os (Millan *et al.*,2005).

En comparaison avec les témoins, l'analyse de nos résultats montre également une augmentation importante de l'activité PAL (figure26) chez les souris traitées par l'AFB1 avec un taux de 83%. En revanche la concentration de la PAL est située dans la norme (en se référant au témoin) chez les souris traitées par l'extrait ACT et BUT avec un taux de 5.51% et 30.71% respectivement.

L'augmentation de la Phosphatase alcaline est un signe de dysfonctionnement biliaire (atteinte hépatique choléstatique) causée, probablement, par l'AFB1. Cependant, la diminution de la

PAL après traitement avec les extraits de *lycium* indique que ces derniers exercent un effet hepatoprotecteur.

Dans le syndrome de cholestase, (la diminution ou l'arrêt de la sécrétion de bile par le foie), l'activité de la PAL s'élève, à cause de l'augmentation de la synthèse de l'enzyme stimulée. Cependant, en pratique, l'augmentation de l'activité des amino-transférases et de la PAL sont fréquentes dans les pathologies hépatiques (Lüllmann *et al.*, 1998). Dans le syndrome de cholestase primaires, il peut y avoir des lésions hépatocellulaires secondaires et une élévation subséquente de l'activité de γ GT à la fois dans un marqueur très sensible mais non spécifique de pathologie hépatique. Ainsi, même si certains profils enzymatiques sont fréquemment observés dans des pathologies hépatiques variées, ils ne sont pas véritablement diagnostiques. L'enzymologie clinique est très utile dans le suivi des pathologies, une fois le diagnostic pose (Marchall et Bangert ; 2004).

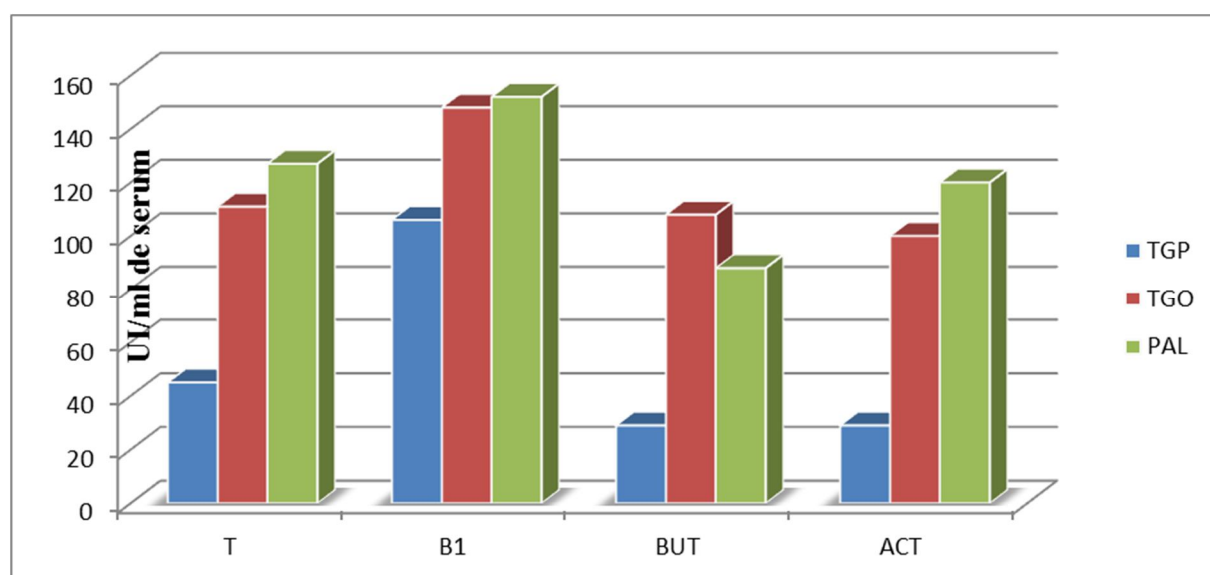


Figure 26 : Paramètres sériques de l'évaluation de la fonction hépatique (GPT, GOT et PAL) des souris traités par la dose de 500mg/kg de l'extrait ACT et BUT et témoins dans les conditions de la toxicité aigüe par la dose de 0,7mg/kg de l'AFB1.

5-Conclusion et perspectives

5. Conclusion et perspectives

Dans ce travail, l'effet hépatoprotecteur de la plante *lycium* contre l'aflatoxine B1, est étudié sur des souris mâle du genre *Swiss albinos*. La production d'AFB1 par *Aspergillus flavus*, analysée par CCM, a révélé la présence de spots de couleur bleu et d'un Rf égal à 0.38, relative à l'aflatoxine B1.

L'étude, *in vivo*, de l'effet l'hépatoprotecteur des extrait ACT et BUT de la plante en question, nous a permis de montrer que l'administration d'aflatoxine B1 à une dose de 0.7 mg/kg chez les souris pendant 7 jours, provoque une hépatotoxicité et perturbe quelques paramètres biochimiques sériques liés à la fonction hépatique traduite par une augmentation des taux sérique de l'ALAT, l'ASAT et la PAL.

D'autre part, l'administration concomitante de l'extrait N butanolique (BUT) et de l'extrait acétate d'éthyle (ACT) de *lycium* à une dose de 500 mg/kg provoque une nette amélioration et normalisation des taux sériques de l'ALAT, l'ASAT et PAL et du statut hépatoprotectrice.

Il ressort de cette étude que la plante *lycium* est une plante prometteuse dans le domaine phytothérapeutique vu sa richesse en molécules bioactive et vu sa capacité protectrice vis-à-vis l'hépatotoxicité. Cette plante peut aussi attribuer à l'amélioration de la viabilité et la régénération des cellules hépatiques.

Les perspectives du présent travail sont encore nombreuses sur ce sujet. Il serait intéressant de confirmer nos résultats par le dosage d'autres paramètres à savoir; les paramètres biochimiques (Albumine, γ Glutamyl transférase glucose, triglycéride, cholestérol) et les enzymes de stress oxydatif (GSH-Px, SOD,...). Il est important aussi de procéder à une étude histologique des organes (rein, foie, cœur) afin de localiser les nécroses causées par l'administration de l'AFB1. Enfin l'identification complète des molécules impliquées dans cet effet hépatoprotecteur, ainsi que le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) intervenant dans les effets pharmacologiques observés sont important à réaliser.

6- Résumés

6. Abstract

A medicinal plant *Lycium* has been exploited in this work, for its effect hepato protective against the mycotoxin AFB1 produced by the strain of *Aspergillus flavus*.

The mycotoxin production in YES medium by *A. flavus* showed the presence of AFB1, analyzed by the thin-layer chromatography and confirmed by adding a standard molecule.

On the other hand, the production of bioactive molecules by the *lycium* plant was carried out by butanol extraction and extraction with ethyl acetate. The yield of the extracts obtained in this case; BUT and ACT extract is 4.54% and 2.03% respectively.

Furthermore, the evaluation in vivo of the effect hepato protective of the plant, conducted in male mice of the genus *Swiss albino*, showed that the administration of aflatoxin B1 for 7 days at a dose of 0.7 mg / kg causes hepatotoxicity and induces disruption of some serum biochemical parameters namely; ALT, AST and ALP. On the other hand, the administration of N-butanol extract (BUT) and ethyl acetate (ACT) extract of *lycium* at a dose of 500 mg / kg caused a remarkable improvement, standardization of rate serum ALT, AST and ALP and the hepatoprotective status.

Keywords: *Lycium*, *Aspergillus flavus*, Aflatoxin B1, hepatotoxicity, ALAT, ASAT, PAL.

ملخص

في هذا العمل قد تم استغلال النبات الطبي اللبسيوم ، لقدرته الوقائية ضد أمراض الكبد و تأثيره الوقائي ضد السموم الفطرية AFB1 التي تنتجها سلالة *Aspergillus flavus*.

أظهر إنتاج السموم الفطرية في وسط YES من طرف *A. flavus* وجود AFB1، الذي تم تحليلها بطريقة كروكاتوغرافيا الطبقي الرقيقة، وإثبات ذلك عن طريق إضافة جزيء القياسية.

من ناحية أخرى، إنتاج الجزيئات الحيوية النشطة من قبل نبتة اللبسيوم تم عن طريق استخراج بالبيوتانول واستخراج بخلات الإيثيل. العائد من المستخلصات التي تم الحصول عليها في هذه الحالة: مستخلص BUT و مستخلص ACT بنسبة 4.54% و 2.03% على التوالي.

وعلاوة على ذلك، فإن التقييم في النموذج الحي للأثر الوقائي للنبتة من أمراض الكبد أجريت على ذكور فئران من جنس الألبينوس السويسري . وتبين أن تناول الأفلاتوكسين B1 لمدة 7 أيام بجرعة 0.7 ملغ / كغ يسبب تسمم الكبد ويؤدي إلى اختلال بعض القياسات البيوكيميائية في الدم وهي : ALT،AST و ALP.

من ناحية أخرى، فإن تناول مستخلص - N-butanol (BUT) ومستخلص خلات الإيثيل (ACT) لنبتة اللبسيوم بجرعة 500 ملغ / كغ أحدثت تحسنا ملحوظا، وتوحيد معدل مصل ALT، AST، و ALP و الحالة الوقائية للكبد.

كلمات مفتاحية : اللبسيوم، الأفلاتوكسين B1 ،أمراض الكبد, ALAT, ASAT,PAL, *A. flavus*

7- Référence bibliographiques

Références bibliographies

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

Amagase, H; Farnsworth, N. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of Lycium fruit (Goji). Food Research International, Vol 7, 44, 2011, pp: 1702-1717.

Ameenah, G. F. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow Molecular Aspects of Medicine, 2006.27:1 -93.

Asao, T; Büchi, G; Abdel-kader, M.M; Chang, S.B; Wick, E.L; Wogan, G.N. Aflatoxins B and G. Journal of American Chemical Society, 1963. 85, 1706.

Asao, T; Büchi, G; Abdel-kader, M.M; Chang, S.B; Wick, E.L; Wogan, G.N. Structures of aflatoxins B and G1. Journal of American Chemical Society, 1965. 87, 822-826.

Azziz-Baumgartner, E. K; Lindblade, K; Gieseke, H. S; Rogers, S; Kieszak, H; Njapau, R. Schleicher, L. F; McCoy, A. Misore and K. DeCock 2005. "Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004." Environmental Health Perspectives: 1779-1783.

Bennett, J. W. Aspergillus: a primer for the novice. Medical Mycology, 2009. 47 (S1): S5-S12.

Bennett, T.W. On overview of the genus Aspergillus. In: Aspergillus. Molecular biology and genomics. Machida M. Gomi K., 2010. 1 -19.

Bennett, J. W; Klich M. Mycotoxins. American Society for Microbiology, 2003.16: 497-516.

Benromdhane, S; Romdhane, M.N ; Feki, M ; Sanhagi, H ; Kaabachi, N ; M'Bazaa, A. Blood biochemistry parameters in dromedary (Camelus dromedarius). Revue Med Vet, 2003.154:695-702.

Bodin, G ; Galthier, P ; Moré, J. Toxine d'Aspergillus ochraceus : toxicité de l'ochratoxine A par administration orale prolongés chez le rat, 1975. P : 207-218.

Bondy, G. S. and J. J. Pestka. "Immunomodulation by fungal toxins." Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews, 2000. 3(2): 109-143.

Bonnier G. La grande flore en couleurs de Gaston Bonnier, Editions Belin, Paris, 1990.

Botton, B ; Breton, A ; Fevre, M ; Gauthier, S ; Guy, P ; Larpent, J.P ; Reymond, P ; Sanglier, J.J., Vayssier, Y. et Veau, P. Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. Masson, Paris, 1990. p : 512.

Botineau, M. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, Editions Tech & Doc., LAVOISIER, 2010.

Broska, M; Moniuszko, M and Pilat, M: "Liver and kidney function and histology in rats exposed to cadmium." *Environ. Med*, 2003.38, 2-20.

Carlborg, F.W. Cancer mathematical models and aflatoxin. *Food Cosmet Toxicol*, 1979. 17: 159 -166.

Chaabi, M. Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : *Euphorbia stenocla* Baill. (Euphorbiaceae), *Anogeissus carpus* Guill. Etperr. (Combrétaceae), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae). Thèse de doctorat en pharmacochimie, Université, Louis Pasteur et Université mentouri de Constantine (Alger), 2008.179, 180.

Chabasse, D. Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale, 2002. pp : 25-27.

Chaivu Rati, T; Viranuvatt, V; Prongsipat, D. Relationship of hepatitis B antigen in cirrhosis and hepatoma in Taïland. *An epidemiological signlftcance, Gastroenterology*, 1975. 68:261-1264.

Chao, J.C. et al., Hot water-extracted *Lycium barbarum* and *Regmannia glutinosa* inhibit proliferation and induce apoptosis of hepatocellular carcinoma cells, *World J. Gastroenterol.*, 28 Jul 2006, 12(28): 4478-84.

Cheng, D; Kong, W. The effect of *lycium barbarum* polysaccharide on alcohol-induced oxidative stress in rats, *molecules*, 2011.16, 2542-2550.

Cole, R.J; Cox, R.H. *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*, New York, Academic Press, 1981. 1-66.

Cronquist, A. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. New York: Columbia University Press, 1981.

Davis, n. D; u. L. Diener, d. W; Eldridge. Production of Aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in a Semisynthetic Medium, *Applied Microbiology*, American Society for Microbiology, Vol 14. N°3,1966.

Deabes, M.M; Darwish, H.R; Abdel-Aziz, K.B; Farag, I.M; Nada, S.A; Tawfek NS. Protective Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on Afltoxins Induced Toxicities in Male Albino Mice. *J Environment Analytic Toxicol*, 2012. 2:132. doi:10.4172/2161-0525.1000132.

Delaveau, P. *Expliquez-moi les plantes, voyage en botanique*, Paris, Editions Pharmathèmes, 2003.

Denli, M; Okan, F. Efficacy of different adsorbents in reducing the toxic effects of aflatoxin B1 in broiler diets. *South African Journal of Animal Science*, 2006. 36, 110-118.

Dia, Y. Recherche et dosage des aflatoxines dans l'huile d'arachide de pression préparée artisanalement dans les régions de Diourbel et Kaolack (Sénégal). Thèse Pharmacie, Dakar, N° 62,1997. P : 74.

- D'Mello, J. P. F; MacDonald, A. M. C. Mycotoxins. Animal Feed Science Technology, 1997. 69, 155-166.
- Dorosz, Ph. Guide pratique des médicaments, 23ème Edition. Paris : Maloine, 2003.
- Droreckova, I; Kusak, V; Vesely, D; Vesela, J; NESNIDAL, P. Aflatoxin and encephalopathy with fatty degeneration of viscera (Reye). Ann. NutT. Aliment, 1977. 31: 977-989.
- Dufour, DR; Lott, J.A; Nolte, F.S; Gretch, D.R; Koff ,R.S; Seeff, L.B. Diagnosis and monitoring of hepatic injury I. Performance characteristics of laboratory tests. Clin Chem. Dec 2000. 46(12):2027-49.
- El-Agamy, D. S. Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B1 - induced liver injury in rats. Arch Toxicol, 2010. 84: 389–396.
- Fao. Alimentation et nutrition - 10. Prévention des mycotoxines. FAO-ROME, 1979. P : 55.
- Frayssinet (C.) et Lafont (P.).Les mycotoxines : un nouvel aspect de l'hygiène des aliments.Cahier de Nutrition et de Diététique, 1966, T.1 : 21-29.
- Fukuda, T; Yokoyama; Ohashi, H. Phylogeny and biogeography of the Genus Lycium (Solanaceae): inferences from chloroplast DNA sequences, Molecular phylogenetics and evolution, vol 19, 2001. Issue 2, 246-258.
- Galtier, P;More, J; Bodin, G. Toxines d'Aspergillus ochraceus Wilhelm. III. Toxicité aiguë de l'ochratoxine A chez le rat et la souris adultes. Ann. Rech. Vétér, 1974. 5233-247.
- Garcia, R. et Cotty, P. J. Rotation des cultures et la température du sol influent sur la structure de la communauté d'Aspergillus flavus dans le sol. Soil Biology & Biochemistry, 2010. 42: 1842–1847.
- Gita Ramjee, P. Aflatoxin, kwashiorkor, and morbidity. Nat Toxins ,2005. 2: 1-3 [PMID: 8032688 DOI: 10.1002/ nt.2620020102
- Gopal, D.V; Rosen, H.R. Abnormal findings on liver function tests. Interpreting results to narrow the diagnosis and establish a prognosis. Postgrad Med. Feb, 2000. 107(2):100-2, 105-9, 113-4.
- Gqaleni, N; Smith, J. E; Lacey, J and Gettinby, G. Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of Aspergillus flavus in surface agar culture. Appl. Environ. Microbiol, vol 63, 1997.N° 3, p: 1048-1053.
- Gu, S;Wang, P.L;Jiang, R. a study on the preventive effect of lycium barbarum polysaccharide on the development of alcoholic fatty liver in rats and its possible mechanism,Zhonghua Gan Zaug bing zazhi, 15mar, 2007. (3):204-8.
- Gugnani, H. C. Ecology and taxonomy of pathogenic Aspergilli. Frontiers in Bioscience, 2003. 8: 346-357.

Guiraud, J. P. Microbiologie alimentaire. Paris: Dunod, 1998. P: 7-330.

Hanak, E ; Boutrif, E ; Fabre, P ; Pineiro, M. Gestion de la sécurité des aliments dans les pays en développement. Actes de l'atelier international, CIRAD-FAO. Cédérom du CIRAD, Montpellier, France, 2002.

Harrigan, W.F; McCance, M.E. Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press. London, 1976. P: 21 -277.

Hatey. mécanisme of the in vitro inhibition of transcription by patuline, a mycotoxin from *Byssochlamys nivea*. FEBS Lett, 1977. 74:121-125

Hilaly, J.E; Israili, Z.H; Lyouss, B. Acute and chronic toxicological studies of Ajuva Iva in experimental animals. Journal of Ethnopharmacology, 2004. 91, 43–50.

Huffman, J., R; Gerber and L. Du. "Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins." Biopolymers, 2010. 93(9): 764-76.

Iarc. "Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins." IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 1997.56.

Imbert, A ; Colombat, M ; Capron, J.P. Démarche diagnostique devant une augmentation modérée et prolongée des transaminases. Presse Med. 2003, 32: 73-8.

Klich, M.A. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 2002. p : 116.

Leroux Manon. Place de la baie de Goji (*Lycium barbarum* L. Solanaceae) parmi les super fruits actuels : ses bienfaits antioxydants. Thèse de Docteur en pharmacie D'université de Rouen, UFR de médecine et pharmacie. France, 2014.

Lewis, L. M; Onsongo, H; Njapau, H; Schurz-Rogers, G; Lubber, S; Kieszak, J; Nyamongo, L; Backer, A. M; Dahiye and A. Misore. "Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya." Environmental Health Perspectives, 2005. 1763-1767.

Lüllmann, H ; Mohr, K ; Ziegler, A. Atlas de poche de pharmacologie, 2^{ème} édition. Paris : Médecine-Sciences, Flammarion, 1998. pp: 32-42.

Luq, Q. Q; Cia, Y; Yun, J; Sun, M. Corke H. hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *lycium barbarum*, life sciences, 2004. 76, 137-149.

Ma, W. G; Tan, R. X; Fuzzati, N; Li, Q. S; Wolfender, J. L; Hostettmann, K. Natural occurring and synthetic polyene glycosides. Phytochemistry, 1997.45(2): 411 - 415.

Maitre, M. Etude d'une plante traditionnelle du tibet : le gogi, *lycium barbarum* (solanaceae), these de doctorat en pharmacie, université de besnçon, 2011.

Marchall, W.J ; Bangert, S.K. Biochimie médicale: physiopathologie et diagnostic, 5^{ème} édition. Française. France : Elsevier, 2004. pp : 59-87.

Meissonnier, G. M. P; Pinton, J; Laffitte, A.M; Cossalter, Y. Y; Gong, C. P; Wild, G; Bertin, P; Galtier and I. P. Oswald. "Immunotoxicity of aflatoxin B1: impairment of the cell mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression." Toxicology and applied pharmacology, 2008. 231(2): 142-149.

Millan Jose Luis. Alkaline phosphatase structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large super family of enzymes. Purinergic signaling, 2005. 2:335-341.

Miller, J.D; Trenholm, H.L. Mycotoxins In Grain/ Compounds Other Than Aflatoxin, 1994. 5, 261-263.

Molinié, A. Qualité sanitaire des blés en région Midi-Pyrénées : suivi du taux de contamination en mycotoxines de stockage (ochratoxine A et citrinine), Etude des effets biologiques de l'exposition à ces deux toxines. Mémoire de thèse, 2004.

Moreau, C. Moisissures toxiques dans l'alimentation. Masson et Cie. Pologne, 1994. P : 322.

Moreau, C. Moisissures toxiques dans l'alimentation, Paris-Vie : Masson et Cie, 1974. P: 471.

Multon, J.L. Conservation et Stockage Des Grains et Graines et Produits Dérivés- Céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux. Paris : Lavoisier, Technique & Documentation, 1982. pp : 576.

Nagy, H ; Aziz; Loutfy, A.A; Mouss. Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits, Food Control, 2002. 13,281-288.

Nemmiche, S; Chabane-Sari D; Guiraud, P. Role of α -tocopherol in cadmium induced oxidative stress in Wistar rat's blood, liver and brain. Chemico-Biological Interactions, 2007. 170: 221-230.

Newberne, P.M. Mycotoxins: Toxicity, carcinogenicity and the influence of various nutritional conditions. Environ. Helth. Perspect, 1974. 9: 1-32.

Ngindu, A. Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya. Lancet, 1982. 1: 1346-46.

Nguyen Minh Tri M. Identification Des Espèces De Moisissures, Potentiellement Productrices De Mycotoxines Dans Le Riz Commercialisé Dans Cinq Provinces De La Région Centrale Du Vietnam - Etude Des Conditions Pouvant Réduire La Production Des Mycotoxines. Thèse De Doctorat D'université : Génie Des Procédés Et De L'environnement, France : Toulouse, Institut National Polytechnique, 2007. P : 147.

Nutranews - BP 30512 - 57 109 THIONVILLE CE D©1997- 2008 Fondation pour le Libre Choix.

Oms. Critère d'hygiène de l'environnement. Principes et méthodes d'évaluation de la toxicité des produits chimiques. Partie I, Genève, Organisation Mondiale de la Santé, 1979. P : 288.

Ong, T.M. Aflatoxin mutagenesis. *Mulot Res*, 1975. 32: 35-53.

Oryan, A; Eftekhari, M.H; Ershad, M; Panjehshahin, M.R; Tabatabaei, H. R. Hepatoprotective effects of whey protein isolate against acute liver toxicity induced by dimethylnitrosamine in rat. *Comp Clin Pathol*, 2011. 20: 251–257.

Oteng-Gyang, K. Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chaud, Paris : Lavoisier, 1984. P: 26-42.

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

Patterson, D.S.P. Structure, metabolism and toxicity of the aflatoxins. A Review *Cah.Nutr. Diet*, 1976. II (suppl 2) : 71-76.

Pfohl- Leszkowicz, A. Métabolisation Des Mycotoxines. Dans Conseil supérieur d'hygiène publique de France, section de l'alimentation et de nutrition. Les mycotoxines dans l'alimentation évaluation et gestion du risque, Lavoisier, France : Technique & Documentation, 1999.pp : 37-55.

Pfohl-Leszkowicz, A et Castegnaro, M. L'Ochratoxine A dans: *Mycotoxines: Evaluation et gestion du risque*, chapitre 9, Paris : Lavoisier, Tec & Doc, 1999. 249-278.

Pfohl-Leszkowicz, A; Petkova-Bocharova, T; Chernozemsky, I. N & Castegnaro, M. Balkan endemic nephropathy and the associated urinary tract tumours: review on etiological causes, potential role of mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 2002.19(3), 282–302.

Pohland, A. E; Nesheim, S and Friedman, L. Ochratoxin A: a review. *Pure and Applied Chemistry*, 1992. 64, 1029-1046.

Pratt, D; Kaplan, M.M; Part, V. Evaluation of the patient with liver disease. *Evaluation of Liver Function*. [auteur du livre] Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL Jameson JL. *Harrison's principles of internal medicine* 16 ème edition, New York : Mc GrayHill Medical Publishing Division, 2005.1813-6.

Prince, A.M; Szuness, W; Michon, J; Demaille, J; Diebolt, G; Linhard, J; Quenum, C; Sankale, M. A case control study of the association between primary liver cancer and Hepatitis B infection in Senegal. *Int.J. Cancer*, 1975. 16: 376-383.

Probst, C; Njapau, H and Cotty, P. J. "Outbreak of an acute aflatoxicosis, 2007, in Kenya in 2004: identification of the causal agent." *Applied and Environmental Microbiology* 73(8): 2762-2764.

Quezel, P & Santa, S. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. 2 tomes, Editions CNRS, Paris: France, 1962-1963. P: 1170.

Rayner, E; Dollear, F. Removal of aflatoxins from oilseed meal by extraction with aqueous isopropanol Journal of the American oil chemists Society, (CD/UPA, N°69034), 1970. 47, nOI, p:26

Reynier, C. Faibles perturbations des transaminases en médecine générale : Analyse des pratiques et étude prospective descriptive des principales étiologies dans la région annécienne de mars à octobre 2010. Thèse De Doctorat en médecine. Grenoble: université Joseph Fourier. France, 2011. P: 175.

Rojas, T.R; Sampayo, C.A.F; Vázquez, B.I; Franco, C.M; Cepeda, A. Study of interferences by several metabolites from *Aspergillus* spp. in the detection of aflatoxigenic strains in media added with cyclodextrin. Food Control, 2005. 16: 445–450.

Rosalki, S; Clin Chem, 1993. 39(4) PP: 648-652.

Sanago, R. Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako(Mali), 2006. 53.

Sargeant, K; Carraghan, R.B & Allcroft, R. Toxic products in groundnuts. Chemistry and origin. Chem. And Ind, 1963.pp.53-55

Schmidt, F.R.; ESSER, K. Aflatoxins: Medical, Economie impact dud prospect for control. Process. Biochem, 1985. P: 167-174.

Scudamore, K.A and Livesey, C.T. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. J. Sci. Food Agric, 1998. 77, 1-17.

Sharamon, S ; Baginski, B. J. La baie de goji-un fruit hors du commun au pouvoir antioxydant surpuissant, Paris : Edition Médicis, 2009. P : 188.

Tabuc, C. Flore Fongique de différents Substrats Et Conditions Optimales De Production Des Mycotoxines. Thèse De Doctorat D'université : Pathologie, Mycologie, Genetique Et Nutrition. Toulouse : L'institut National Poly Technique et de l'université De Bucarest. France, 2007. P: 190.

Tung, H.T; Hamilton, P. B. Decrease plasma carotenoids during aflatoxicosis. Poultry Science, 1973. 52, 80-83.

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

Varga, J J. C; Frisvad and R. A. Samson. "Two new aflatoxin producing species and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*." Studies in Mycology, 2011. 69: 57-80.

Ward, O. P; Qin, W.M; Dhanjoon, J; Ye; J; Singh, A. Physiology and Biotechnology of Aspergillus. *Advances in Applied Microbiology*, 2006. 58: 1-75.

Wenger, C. Alkaline phosphatase. Kaplan, A. *ClinChem the C.V*, 1984. PP: 1094-1098.

Who, S. Environmental health criteria - 105. Selected mycotoxins : ochratoxine, trichotecene, ergot. Who Geneva, 1990.

Wilkinson, H.H; Ramaswamy, A; Sim, S. C; Keller, N. P. Increased conidiation associated with progression along the sterigmatocystin biosynthetic pathway. *Mycologia*, 2004. 96(6): 1190–1198.

Worg, J.J; Hsieh, D.P.H. Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potentiel. *Proc. Nat Acad Sei, USA*, 1976. 73: 2241-2244.

Wray, B.B. aflatoxins, hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *N. EngL J. Med*, 1982. 305, 833.

Wu, H et al., Effect of Lycium barbarum polysaccharide on the improvement of antioxidant ability and DNA damage in NIDDM rats, *Yakugaku Zasshi*, May, 2006.126(5): 365-71.

Wu, H.T; Heb, X.J; Hong, Y.K; MA, T; Xu, Y.P; Li, H.H. chemical characterization of lycium barbarum polysaccharides and its inhibition against liver oxidative injury of high-fat mice, *international journal of biological macromolecules*, vol.46,2010.540-543.

Xiaq, J; Liong, A.C; Ching, Y.P; Chan, G.R.C; So, K.F; Fung, M.L; Tipoe, G.L. Lycium barbarum polysaccharides, protect mice liver from carbon tetrachloride-induced oxidative stress and nectoinflammation, *journal of Ethnopharmacology*, 2012 .139,462-470.

Yiannikouris, A ; Jouany, J-P. Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. *INRA Productions Animales*. Vol 15, 2002. (1), pp: 3-16.

Yu, M.S. et al., Neuroprotective effects of anti-aging oriental medicine Lycium barbarum against beta-amyloid peptide neurotoxicity, *Exp. Gerontol*, Aug-Sep, 2005. 40(8-9): 716-27.

Zhao, R. et al., Effect of Lycium barbarum polysaccharide on the improvement of insulin resistance in NIDDM rats, *Yakugaku Zasshi*, Dec, 2005. 125(12): 981-988.

Références sitographique

1. www.heds-ge.ch

- <http://www.heds-ge.ch/diet/encyclopedie/baie-de-goji-09.pdf>, GIORDANO I., La baie de goji un trésor de la nature, Haute école de santé de Genève

2. www.medicine-integree.com/

- <http://www.medicine-integree.com/attachments/1642-Lycium-barbarum.pdf>

8- Annexe

Annexe 1

Composition des milieux de cultures

Potato Dextrose Agar (PDA)

Pomme de terre.....	200 g
Glucose.....	20 g
Agar.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH = 6.6	

Yeast Extract Sucrose (YES)

Extrait de levure en poudre.....	10 g/l
Sucrose.....	20g/l
Litre d'eau distillé.....	½ g/l
La stérilisation du milieu se fait à 121°C pendant 20 min.	
pH = 5,5	

Solution d'eau physiologique

Nacl.....	9 g
Eau distillée.....	1000 ml

Annexe 2

Tableau Taux des transaminases chez les souris témoins d'AFT B1 et traités.

Paramètres lots	ALAT (TGP) (10-45 u/L)	ASAT (TGO) (10-45 u/L)	PAL (45-129 u/L)
B1 (4ème jours)	76↗	100↗	140↗
B1 (5ème jours)	136↗	148↗	165↗
BUT (5ème jours)	25	19	117
BUT (8ème jours)	12	57	59
ACT (5ème jours)	26	16	155
ACT (8ème jours)	29	17	84
ACT (8ème jours)	33	43	135

Etude de l'effet antihépatotoxique d'une plante médicinale du genre *lycium*

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie des mycètes.

Résumé

Une plante médicinale du genre *lycium* a été exploitée, dans ce travail, pour son effet l'hépatoprotecteur contre la mycotoxine AFB1 produite par une souche d'*Aspergillus flavus*.

La production de mycotoxine sur milieu YES par *A. flavus* a montré la présence de l'AFB1 analysée par la chromatographie sur couche mince et confirmée par l'ajout d'une molécule standard.

D'autre part, la production de molécules bioactives, par la plante *lycium*, a été effectuée par une extraction butanolique et une extraction par l'acétate d'éthyle. Le rendement des extraits obtenus en l'occurrence; extrait BUT et ACT est 4,54% et 2,03% respectivement.

Par ailleurs, l'évaluation, in vivo, de l'effet l'hépatoprotecteur de la plante, effectuée chez des souris mâle du genre *Swiss albinos*, a montré que l'administration de l'aflatoxine B1 pendant 7 jours à une dose de 0.7 mg/kg, provoque une hépatotoxicité et induit la perturbation de certains paramètres biochimiques sériques à savoir ; l'ALAT, l'ASAT et la PAL. D'un autre côté, l'administration de l'extrait N-butanolique (BUT) et de l'extrait acétate d'éthyle (ACT) de *lycium* à une dose de 500 mg/kg provoque une amélioration remarquable et une normalisation des taux sériques de l'ALAT, l'ASAT et de la PAL ainsi que le statut hépatoprotectrice.

Mots clés : *Lycium*, *Aspergillus flavus*, Aflatoxine B1, hépatotoxicité, ALAT, ASAT, PAL.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université des Frères Mentouri 1, Constantine.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr. DEHIMAT L.	(Professeur - UFM Constantine).
Rapporteur : Mme. YOUCEF ALI M.	(MCB - UFM Constantine).
Tuteur : Mme. MOSBAH K.	(MAA- UFM Oum El Baoughi).
Examinatrice : Mme. ZITOUNI H.	(MAB- UFM Constantine).

Date de soutenance : 12/06/2016