

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MER ET DE L'AQUACULTURE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Fartas Zohra – Abbou Meriem

Pour l'obtention du diplôme

Master 2

Hydrobiologie Marine ET Continentale

Spécialité: Ressources Halieutiques

THÈME

**Contribution à l'étude toxicologique des métabolites
secondaires fongiques isolés de poissons d'aquaculture**

Test sur *Artémia salina* (Linnaeus, 1758)

Soutenue publiquement le 12/09/2019

DEVANT LE JURY :

Président :	Dr Nardjess Benamar	MCA	U. Mostaganem
Examineur :	Dr Ait Mohamed amer Lilia	MCB	U. Mostaganem
Encadreur :	Mme Benmessaoud Nadjat.	MAA	U. Mostaganem

*Thème réalisé au « Laboratoire de Microbiologie 01- Laboratoire Halieutique » de la faculté
SNV, Université de Mostaganem.*

Remerciement

❖ *Au Bon Dieu, le tout puissant, pour nous avoir assuré la vie jusqu'à ce jour et permis de poursuivre nos études et réaliser ce modeste travail.*

Qu'Allah, le clément et le miséricordieux, puisse continuer à nous aider jusqu'à la fin de nos jours, tout en nous assurant une bonne santé physique et morale, car : « nul n'est infailible et saint d'esprit sauf le tout puissant et nul n'échappera à sa destinée ».

*Tous d'abord nous tenons à exprimer notre plus profonde gratitude envers notre encadreur **Mme Nadjet Benmessaoud** Maitre Assistante A au Département des Sciences de la Mer et de l'Aquaculture à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Université de Mostaganem , merci pour sa disponibilité, son aide , ses conseils, la correction du manuscrit , et pour sa patience , sa confiance , son encouragement , et son oeil critique qui nous a été très précieux pour structurer le travail et pour améliorer la qualité des différentes sections de notre mémoire merci pour tout.*

*Nous tenons aussi à exprimé toute notre gratitude au Docteur **Nardjess Benamar**, Maitre de conférence A au Département des Sciences de la Mer et de l'Aquaculture de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury de mémoire.*

*Nos remerciements vont aussi au **Docteur Ait Mohamed Amer Lilia**, Maitre de conférences B au Département des Sciences de la Mer et de l'Aquaculture d'avoir accepté d'examiner notre travail, avec bienveillances et nous en sommes très honorés.*

*Nous remercions également chaleureusement **Mr Toufik BOUKHATMI**, pour son aide apporté dans la partie pratique de notre travail.*

*Nos vifs remerciements vont aussi au **Pr Karim Mezali** directeur du laboratoire, « Protection, Valorisation des Ressources Marines Littorales » d'avoir accepté de nous confier son laboratoire pour la réalisation d'une partie de nos essais.*

Nous tenons à remercier également le responsable des laboratoires pédagogique de la faculté des Séances de la Nature et de la Vie et l'ensemble des ingénieurs et techniciens des laboratoires. Un grand merci

Dédicaces

Au nom d'Allah clément et miséricordieux

Je dédie ce travail :

Aux deux êtres qui l'auraient espéré plus que moi :

Ma mère et mon père je ne peux jamais imaginer une vie sans eux.

Merci

*pour leur patience, pour leur soutien infini; pour leurs conseils d'or
tout*

*au long de ma vie et l'aide qui m'ont offert tout au long de mes années
d'études.*

Je le dédie aussi :

A mon cher frère : Mohamed Islem

A mes chères sœurs : Asmae, Alia, Iméne.

Je le dédie aussi à:

Mes chères Amies : Sihem, Hanene.

Sans oublier mon binôme : Zohra

A toute ma famille, à mes oncles, et tantes.

A tous mes enseignants, je leurs exprime ma profonde gratitude.

A tous les étudiants de la promotion Ressources halieutiques

Et tous ceux que j'aime.

Abbou Meriem

Dédicaces

Au nom d'Allah clément et miséricordieux

Je dédie ce travail :

Aux deux êtres qui l'auraient espéré plus que moi :

Ma mère et mon père je ne peux jamais imaginer une vie sans eux.

Merci

*pour leur patience, pour leur soutien infini; pour leurs conseils d'or
tout*

*au long de ma vie et l'aide qui m'ont offert tout au long de mes années
d'études.*

Je le dédie aussi :

A mon cher frère : Mohamed elhabib

A mes chères sœurs : Karima, Souhila, Douaae, Radia

Je le dédie aussi à:

Mes chères Amies : Sihem, Hanen .

Sans oublier mon binôme : Meriem

A toute ma famille, à mes oncles, et tantes.

A tous mes enseignants, je leurs exprime ma profonde gratitude.

A tous les étudiants de la promotion Ressources halieutiques

Et tous ceux que j'aime.

Fartas Zohra

Résumé

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires et des substances toxiques sécrétées par des champignons microscopiques ou moisissures. Elles sont connues surtout en raison des intoxications qu'elles provoquent chez les animaux et l'homme suite à la consommation d'aliments contaminés. Plus de 300 métabolites secondaires ont été identifiés mais seule, une trentaine possède de réelles propriétés toxiques préoccupantes.

Notre travail a porté sur l'étude de la toxicité des moisissures du genre *Penicillium*, *Aspergillus* et *Alternaria*, isolées de deux espèces de poissons d'aquaculture à savoir : La daurade royale "*Sparus aurata*" et loup de mer "*Dicentrarchus labrax*". Nous avons utilisé le test de toxicité aiguë sur larves d'*Artemia salina*, qui est un test sensible et fiable, de faible coût et de mise en œuvre facile. Du fait de son large spectre de détection, c'est un bon test de criblage de toxicité, et en particulier, il est très approprié à la détection des mycotoxines. C'est pourquoi nous l'avons retenu pour l'étude de la toxicité des métabolites produits par les champignons isolés du milieu marin, ce qui est d'autant plus intéressant que *A. salina* est aussi un organisme marin.

Pour une étude plus approfondie, nous avons déterminé la concentration létale médiane (CL₅₀) des souches préalablement sélectionnées comme étant potentiellement toxiques.

Mots clés : Mycotoxines, métabolites secondaires, *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*, *Artemia salina*, CL₅₀.larves.

المخلص

السموم الفطرية هي مستقلبات ثانوية ومواد سامة تفرزها الفطريات المجهرية أو العفن. وهي معروفة بشكل رئيسي بسبب التسمم الذي تسببه في الحيوانات والبشر بعد استهلاك الأغذية الملوثة. تم تحديد أكثر من 300 مستقلب ثانوي ، لكن 30 فقط لديهم خصائص سامة حقيقية.

ركز عملنا على دراسة سمية العفن من جنس البنسيليوم ، الرشاشيات و التيرناليا المعزولة من نوعين من الاسماك

الاستزراع المائي : *Dicentrarchus labrax* , *Sparus aurata* :

استخدمنا لاختبار السمية الحادة *Artemia salina* والذي يعد اختبارًا حساسًا وموثوقًا ، منخفض التكلفة وسهل التنفيذ. بسبب الطيف الواسع للكشف ، فهو اختبار جيد لفحص السمية ، وبشكل خاص ، إنه مناسب للغاية للكشف عن السموم الفطرية. هذا هو السبب في أننا استخدمناها لدراسة سمية الأيضات التي تنتجها الفطريات المعزولة من البيئة البحرية ، وهو أمر مثير للاهتمام لأن *Artemia salina* هي أيضا كائن حي بحري

لمزيد من الدراسة ، حددنا متوسط التركيز المميت (CL_{50}) سلالات التي تم تحديدها سابقًا على أنها محتملة ان تكون سامة

الكلمات المفتاحية: السموم الفطرية ، المستقلبات الثانوية ، *Dicentrarchus labrax* , *Sparus aurata* ،

Artemia salina ، CL_{50} ، اليرقات

Abstract

Mycotoxins are secondary metabolites and toxic substances secreted by microscopic fungi or molds. They are known mainly because of the poisoning they cause in animals and humans following the consumption of contaminated food. More than 300 secondary metabolites have been identified, but only 30 have real toxic properties of concern.

Our work focused on the study of the toxicity of molds of the genus *Penicillium*, *Aspergillus* and *Alternaria*, isolated from two species of aquaculture fish namely: The sea bream "*Sparus aurata*" and sea bass "*Dicentrarchus labrax*". We used the *Artemia salina* larval acute toxicity test, which is a sensitive and reliable test, low cost and easy to implement. Because of its broad spectrum of detection, it is a good test for toxicity screening, and in particular, it is very suitable for the detection of mycotoxins. This is why we used it to study the toxicity of metabolites produced by fungi isolated from the marine environment, which is all the more interesting because *A. salina* is also a marine organism.

For further study, we determined the median lethal concentration (CL₅₀) of strains previously selected as potentially toxic.

Key words: Mycotoxins, secondary metabolites, *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax* ", *Artemia salina*, CL₅₀, larvae.

Liste des Abréviations

% : Pourcent .

M %: Pourcentage de mortalité.

[C]: Concentration.

T° : Température.

C° : Degrés Celsius.

PDA : Potato-dextrose-agar.

CYA: Czapeck Yeast Agar.

CL₅₀: Concentration létale qui provoque 50% de mortalité dans la population d'organismes étudiée

Liste des figures

Figure 1: Classification des mycètes (champignons)	4
Figure 2 : Cycle de vie des moisissures.	5
Figure 3 : Les différentes structures des hyphes fongiques	6
Figure 4 : Reproduction chez les champignons.	7
Figure 5: Répartition de l' <i>Artemia</i> dans le monde.	16
Figure 6: <i>Artemia salina</i> adulte.	19
Figure 7 : Mâle et femelle d' <i>Artemia</i> .	20
Figure 8 : Femelle adulte vue latéral	22
Figure 9 : Cycle de vie de l' <i>Artemia salina</i> .	23
Figure 10 : Cystes d' <i>Artemia</i> .	24
Figure 11 : Structure de cyste de l' <i>Artemia</i> .	23
Figure 12 : Les souches après 10 jours d incubation.	30
Figure 13 : Agitation vigoureuse à l'aide d'un barreau magnétique.	30
Figure 14 : Les souches après 21 jours d incubation.	31
Figure 15 : Filtration du milieu de fermentation.	31
Figure 16: Les cystes d' <i>Artemia salina</i>	33
Figure 17 : Ecllosion des cystes.	33
Figure 18 : plaques de culture.	34
Figure 19 : Teste de létalité CL50.	35
Figure 20: Courbes de taux de mortalité.	38
Figure 21 : Valeurs des concentrations de létales «CL ₅₀ »	39

Liste des tableaux

Tableau 01: Les principales mycotoxines et leurs effets.	12
Tableau 02: Quelques espèces fongiques productrices de mycotoxines.	13
Tableau 03 : Les sites potentiels d' <i>Artemia</i> connus en Algérie.	17
Tableau 04: Souches fongiques sélectionnée.	28
Tableau 05 : Résultats de l'activité de toxicité.	36
Tableau 06 : Pourcentage de mortalité pour les différentes concentrations.	37
Tableau 07 : CL ₅₀ calculées pour les souches sélectionnées.	39

Table des matières

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Introduction générale 1

Chapitre I : SYNTHÈSES BIBLIOGRAPHIQUES

Partie I : Généralités sur les champignons

I.1-Introduction	2
I.1.2. Classification des Champignons	2
I.1.3. Cycle de vie des champignons	4
I.1.4. Morphologie	5
I.1.5. Croissance	6
I.1.6. Modes de reproduction des champignons	6
I.2. Champignons marins	7
I.2.1. Définition	7
I.2.2. Rôle des champignons en milieu marin	8
I.2.3. Champignons marins et activité biologique	8
I.3. Moisissures et mycotoxine	9
I.3.1. Généralités	9
I.3.2. Nature et origine des mycotoxines	11
I.3.3. Effets des mycotoxines	11
I.3.4. Moisissures mycotoxinogènes	12
I.3.5. Principales mycotoxines	13
I.4. Infection fongique des poissons d'élevage	14

Table des matières

Partie II : Généralités sur l'*Artemia*

II.1. Répartition géographique de l' <i>Artemia</i>	16
II.1.1 <i>Artemia</i> dans le monde	16
II.1.2. <i>Artemia</i> en Algérie	16
II.2. Systématique, biologie et écologie de l' <i>Artemia</i>	18
II.2.1. Définition d' <i>Artemia</i>	18
II.2.2. Classification systématique	19
II.2.3. Reproduction d' <i>Artemia</i>	20
II.2.4. Régime alimentaire	21
II.3. Types d' <i>Artemia</i>	21
II.3.1. <i>Artemia franciscana</i>	21
II.3.2. <i>Artemia salina</i>	21
II.4. Morphologie et cycle de vie d' <i>Artemia salina</i>	21
II.4.1. Morphologie de l'espèce	21
II.4.2. Cycle de vie	22
II.4.3. Nauplius	23
II.4.4. Cyste	23
II.4.5. Structure de cyste d' <i>Artemia</i>	24
II.5. Conditions de formation des cystes	24
II.6. Conservation et éclosion des cystes	24
II.6.1. Conservation	24
II.6.2. Eclosion	25
II.7. Paramètres de la qualité de l' <i>Artemia</i>	25
II.8. Intérêt de l' <i>Artemia</i>	25
II.9. Utilisation d' <i>Artemia</i>	25
II.9.1 . Applications d' <i>Artemia</i> pour alimenter les différentes espèces en Aquaculture	26
II.10. <i>Artemia</i> en éco-toxicologie	27

Table des matières

Chapitre II : Matériels et Méthodes

1.Souches de champignons étudiées .	28
2. Repiquage et identification des souches sélectionnées	29
2.1. Repiquage des souches sur milieu sabouraud	29
2.1.1. Identification	29
2.1.1.1. Identification macroscopique	29
2.1.1.2. Identification microscopique	29
3. Production des metabolites secondaires sur milieu de fermentation	30
3.1. Ensemencement du milieu de fermentation	30
3.2 Filtration à partir du milieu de fermentation	31
4. Test de toxicité	31
4.1. Test de toxicité aiguë sur les larves <i>d'Artemia salina</i>	31
4.1.1. Eclotions des larves	31
4.1.2. Détection des souches fongiques actives	32
4.1.2.1. Préparation des plaques et incubation	32
4.1.2.2. Lecture	33
5. Détermination de la CL ₅₀ des souche actives	33
5.1. Préparation des plaques	33
5.2. Calcul des CL ₅₀	34

Chapitre III : Résultat et Discussion

II-Résultats et discussion	36
I-1- Sélection et étude des souches actives	36
I-2-Determination de CL ₅₀	39
Conclusion et perspectives	41
Référence bibliographique	43
Annexe	

Table des matières

Table des matières

Introduction générale

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

En effet, Les mycotoxines sont des métabolites secondaires, toxiques, de faible poids moléculaire (entre 200 et 10.000 daltons), excrétées par certaines moisissures qui se développent sur divers produits agricoles sous des conditions environnementales particulières (Krska, 2009).

Les mycotoxines, produites par divers mycètes ou champignons des genres *Aspergillus*, *Alternaria* et *Penicillium*, peuvent contaminer facilement les poissons de pisciculture. Les plus communes sont les aflatoxines et l'ochratoxine A. Cependant, les informations sur l'impact des mycotoxicoses sont assez rares et la plupart des informations proviennent d'études expérimentales.

Les effets toxicologiques chez les poissons dépendent du type de mycotoxine et de la relation dose-exposition à laquelle les poissons sont soumis. Dans les intoxications subchroniques, on observe généralement un arrêt de croissance, des altérations de l'état général, des atteintes d'organes spécifiques impliquant notamment le foie, les organes, les branchies, une immunosuppression combinée à une sensibilité accrue aux agents pathogènes opportunistes et, pour les aflatoxines, une incidence élevée des tumeurs hépatiques. Toutefois, des variations importantes de la toxicité sont liées à divers facteurs, en particulier l'espèce et l'âge du poisson.

Dans le cadre de cette étude, nous avons réalisé une série de tests de toxicité, dans le but de rechercher la présence des mycotoxines chez des poissons contaminés par les champignons.

Un biotest basé sur la sensibilité de larves d'une crevette marine *Artemia salina*, a été développé afin de déterminer les effets toxiques des métabolites secondaires produits par certaines souches fongiques isolées de deux espèces de poissons d'aquaculture. Le présent travail est réparti en trois parties qui se présentent comme suit:

Le premier chapitre: synthétisant les rappels bibliographiques sur les peuplements fongiques en première partie, ainsi que sur *Artémia salina*, le model expérimental utilisé, en deuxième partie;

Le deuxième chapitre: portant sur les expérimentations réalisées, en détaillant la méthodologie suivie afin de réaliser les tests de toxicité;

Le troisième chapitre: consacré pour les résultats obtenus ainsi que leurs discussions;

Enfin une conclusion et perspectives.

Partie I : Généralités sur les champignons

I.1- Introduction

Les champignons représentent l'un des plus importants groupes d'organismes sur terre et jouent un rôle clé dans un grand nombre d'écosystèmes (Mueller et Schmit, 2007). Ce sont des organismes eucaryotes, à mode de reproduction sexuée ou asexuée. Les spores produites peuvent avoir un rôle dans la dispersion des champignons, mais peuvent également jouer un rôle dans la survie de l'organisme lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (Madelin, 1994). Leur mode de nutrition se fait par absorption en libérant dans un premier temps des enzymes hydrolytiques dans le milieu extérieur. Ces organismes sont dépourvus de chlorophylle et sont tous hétérotrophes ; le glycogène est le polysaccharide de réserve principal (Carlile et Watkinson, 1994 ; Redecker, 2002). Tous les champignons ont une paroi constituée de chitine, polysaccharide très résistant constitué de résidus N-acétylglucosamine (Carlile et Watkinson, 1994). D'un point de vue structural, on trouve une grande variété de champignons. Ils sont classés en deux grandes catégories : la forme levure unicellulaire et la forme mycélienne pluricellulaire constituée d'hyphes (Redecker, 2002). Certaines espèces ont la capacité d'adopter les deux formes, levure et mycélienne, tandis que d'autres sont restreintes à l'une ou l'autre (Jennings et Lysek, 1996). La forme levure apporte un avantage pour la croissance dans les milieux où la pression osmotique est forte car cela diminue la surface de l'organisme. La forme mycélienne permet au champignon d'avoir une croissance radiale importante et de coloniser rapidement un milieu. Cette forme mycélienne assure donc une surface maximale de contact et permet une exploration et une recherche de nutriments dans les trois dimensions (Carlile et Watkinson, 1994 ; Jennings et Lysek, 1996). D'un point de vue métabolique les champignons sont des chimiohétérotrophes, c'est à dire qu'ils utilisent du carbone organique comme source d'énergie (Carlile et Watkinson, 1994 ; Redecker, 2002). Ce sont des organismes aérobies pour la grande majorité, mais certaines levures peuvent être aéro-anaérobie et participer à des processus fermentaires (Carlile et Watkinson, 1994).

I.1.2. Classification des Champignons

Les champignons ont fait l'objet de classifications multiples et complexes. Elles sont en constante évolution (Barnett et Barry, 1972 ; Botton *et al.*, 1990 ; Bouchet *et al.*, 1999).

On distingue globalement 03 divisions selon (Strullu, 1991 ; Davet, 1996) :

- Division 1 : GYMNOMYCOTA : champignons à zoïdes, cellules dépourvues de paroi (présence de myxamibes et de plasmodes);
- Division 2 : MASTIGOMYCOTA : champignons à zoïdes (présence de spores mobiles);

- Division 3 : AMASTIGOMYCOTA : champignons sans zoïdes (pas de cellules mobiles, pas de flagelles).

Les champignons sont subdivisés en cinq sous embranchements :

a) Zygomycotina ou Zygomycète : Il est présentée essentiellement par les zygomycètes, ils comprennent environ 200 espèces, rassemblent des champignons saprophytes, ainsi que des champignons parasites d'insectes (Entomophthorales), de nématodes et d'amibes (Zoopagales), de plantes, des animaux et des hommes (mucormycoses) et surtout des contaminants de nombreux produits alimentaires (Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron, 1996). Certaines Mucorales sont parfois utilisées industriellement en raison de leurs activités enzymatiques (amylase, protéase,...) comme *Rhizopus* et *Mucor* (Guiraud, 1998). Les Zygomycètes sont caractérisés par un mycélium siphonné ou coenocytique (Guiraud, 1998), une reproduction asexuée le plus souvent par sporocystospore et une reproduction sexuée par fusion de gamétocyste.

b) Ascomycotina ou Ascomycète : les Ascomycètes comprennent environ 15.000 espèces, auxquelles il faut ajouter un nombre à peu près équivalent d'espèces lichénisantes. Elles sont cependant plus particulièrement nombreuses dans l'ordre des Eurotiales, des Microsciales et des Sphaeriales. Dans cette classe, le genre le plus connu est *Endothia* et *Neurospora* (Bourgeois, 1989). Ils sont caractérisés par un mycélium cloisonné ou unicellulaire (levure) ; une reproduction asexuée par des conidies et une reproduction sexuée par formation de spore méiotique (ascospores) dans des asques.

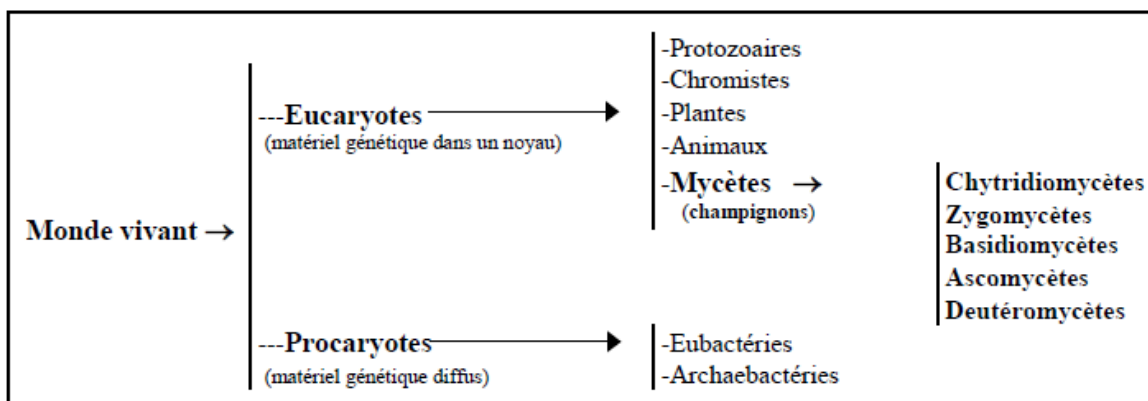
c) Basidiomycotina ou Basidiomycète : Il existe environ 20.000 espèces, ce sont des champignons que l'on peut considérer comme les plus perfectionnés. Ils sont caractérisés par un mycélium cloisonné ou unicellulaire (levure), une reproduction asexuée par des conidies et une reproduction sexué par formation de méiospore (basidiospore) dans des basides, c'est le cas de *Agaricus* et *Coprinus* (Botton et al., 1999).

d) Deutéromycotina ou Deutéromycètes (champignons imparfaits) : encore appelés Adélomycètes. Les Deutéromycètes ne constituent pas un groupe naturel, mais d'un ensemble artificiel regroupant environ 15.000 espèces (plus du quart des champignons actuellement connus). Ils sont caractérisés par un thalle en général cloisonné ou unicellulaire, ne présentant jamais, ou très exceptionnellement, de forme de reproduction sexuée ; la plupart présentent, néanmoins, des affinités d'Ascomycètes et ils se reproduisent uniquement par voie végétative au moyen de spores asexuées (conidie) ou par simple fragmentation du mycélium (arthroconidie) (Boiron, 1996). Le groupe des Deutéromycètes contient un grand nombre de contaminants de végétaux et de produits alimentaires : *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, cette classe regroupe aussi les *Penicillium* et les *Aspergillus* (Frazier, 1967 ; Punt et al., 2002).

Les Deutéromycètes se divisent en trois sous-classes :

- Les **Blastomycètes** : Levures avec ou sans pseudo mycélium.
- Les **Hyphomycètes** : Champignons filamenteux, stériles (**Agonomycétales**) ou produisant leurs spores directement sur les hyphes ou sur des conidiophores simples ou agrégés (**Moniliales**).
- Les **Coelomycètes** : Conidies produites dans des pycnides (**Sphaeropsidiales**) ou dans des acervules (Mélanconiales).

e- CHYTRIDIOMYCOTA OU CHYTRIDIOMYCETES : sont les seuls champignons à posséder des spores uniflagellées (zoospores) (Jennings et Lysek, 1996). La présence de spores flagellées semble restreindre ces organismes aux milieux aquatiques et dans les sols humides (James et *al.*, 2000). Environ 1000 espèces ont été décrites au sein de cette classe, ce qui correspond à environ 1% des espèces décrites de champignons. La plupart sont des saprophytes, aérobies ou anaérobies; ils sont pathogènes ou de parasites d'algues. Ils sont souvent microscopiques mais peuvent aussi produire un mycélium.



Adapté de : Blackwell *et al.* (1998)

Figure 01: Classification des mycètes (champignons) d'après Blackwell et *al.*(1998).

I.1.3. Cycle de vie des champignons

C'est au niveau du cycle de développement et des modalités de reproduction sexuée que apparaissent les différences entre les sous embranchements des champignons. Au cours de cette étude, nous nous intéressons uniquement au champignon filamenteux ou moisissures.

Le cycle de vie des moisissures, débute lorsqu'une spore se dépose sur une surface lui offrant les conditions nécessaires à sa croissance. En fait, la germination se déclenche par la présence d'eau combinée ou non à certains facteurs très spécifiques comme l'intensité lumineuse, certaines températures ou types d'éléments nutritifs. La spore germera alors et donnera naissance à un premier filament non différencié, appelé hyphe, qui s'allongera pour former un ensemble appelé mycélium. Cet ensemble de filaments, plus ou moins ramifiés, constitue le thalle des champignons. En présence de conditions favorables à la sporulation, le mycélium donnera

naissance à des structures plus spécialisées, qui produiront des spores asexuées (conidies) ou, plus rarement, des spores sexuées.

Chaque champignon produit un très grand nombre de spores dont l'ensemble, appelé sporée, se présente très souvent sous un aspect poudreux et coloré à la surface de la moisissure.

La taille, la forme et la couleur des spores de moisissures varient grandement d'une espèce à l'autre. Par contre, en microscopie, toutes les spores d'une même espèce sont de couleur, de dimension et de forme relativement constante ce qui, dans bien des cas, constitue un élément d'identification taxonomique (Acgih, 1999).

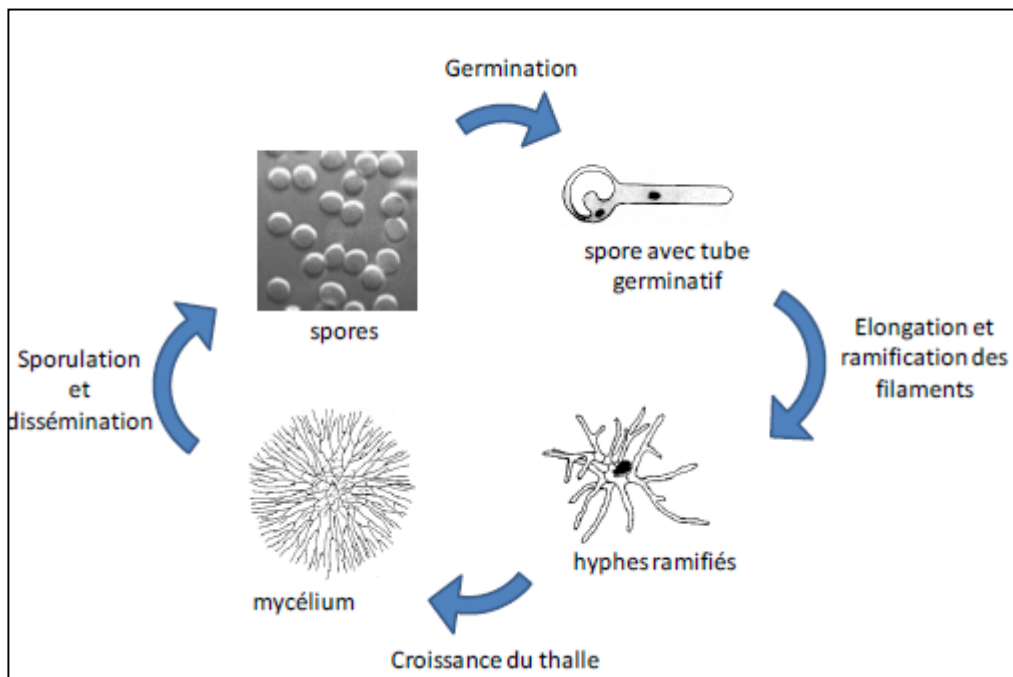


Figure 02 : Cycle de vie des moisissures (www.aspergillus.man.ac.uk).

I.1.4. Morphologie

Elles sont multicellulaires mais la notion de cellule est assez floue car la structure est mycélienne et coenocytique. La paroi est riche en cellulose ou en chitine. Le corps ou thalle d'une moisissure est fait de deux parties : Le mycélium et les spores. Le mycélium est un ensemble de plusieurs filaments appelés hyphes. Chaque hyphe mesure 5 à 10 μm de diamètre possède un cytoplasme commun (Ait Abdelouahab, 2001). Chez la plupart des moisissures, les hyphes sont divisés par les cloisons ou septa (septum singuliers) on les appelle alors hyphes segmentés ou septés ; Dans quelques classes de mycètes, les hyphes ne contiennent pas de cloisons et ont l'aspect de longues cellules continues à noyaux multiples ; ils sont appelés cénocytes (Tortora et *al.*, 2003) (Fig. 03).

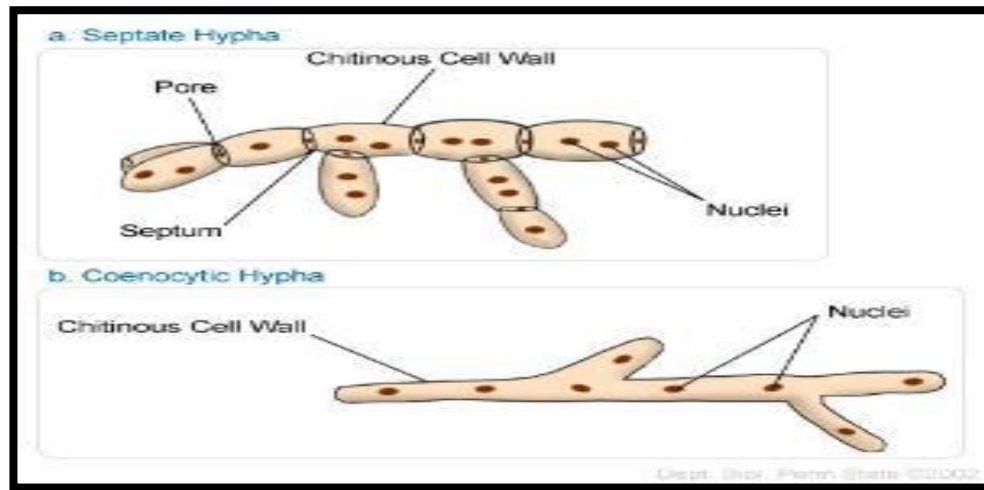


Figure 03 : Les différentes structures des hyphes fongiques.

I.1.5. Croissance

La croissance des champignons mycéliens est assurée par des hyphes qui sont constitués de cellules hétérocaryotiques (Ascomycota et Basidiomycota) ou coenocytiques (Zygomycota et Glomeromycota). Leur extension est restreinte à l'apex. Après division, l'article apical nouvellement formé peut se séparer du reste du mycélium par une cloison (mycélium septé) ou non (mycélium siphonné) (Jennings et Lysek, 1996). Les hyphes vont se brancher en réseau, déterminant en partie la morphologie macroscopique du thalle (Carlile et Watkinson, 1994). La croissance et la nutrition vont se faire de façon concomitante ; la croissance sera réalisée par une extension de la paroi à l'apex, par un apport continu de chitine. Dans le même temps, au niveau de l'apex également, des enzymes hydrolytiques seront déversées dans le milieu extérieur (Carlile et Watkinson, 1994).

I.1.6. Modes de reproduction des champignons

Les champignons présentent deux types de reproduction :

- **Reproduction asexuée** : Les spores représentent le mode de reproduction asexué le plus commun chez les champignons, elles sont produites soit dans des sporanges, soit à partir de cellules d'hyphes appelées cellules conidiogènes (Raven et *al.*, 2000).
- **Reproduction sexuée** : Elle est assurée par des gamètes ou des spores formées à la suite d'une méiose. Cette reproduction sexuée est très variable tant sur le plan de la diversité des organes que sur celui des cycles de développement. La fécondation peut s'effectuer chez un même individu (homothallisme) ou entre deux individus différents (hétérothallisme) (Sterullu, 1991).

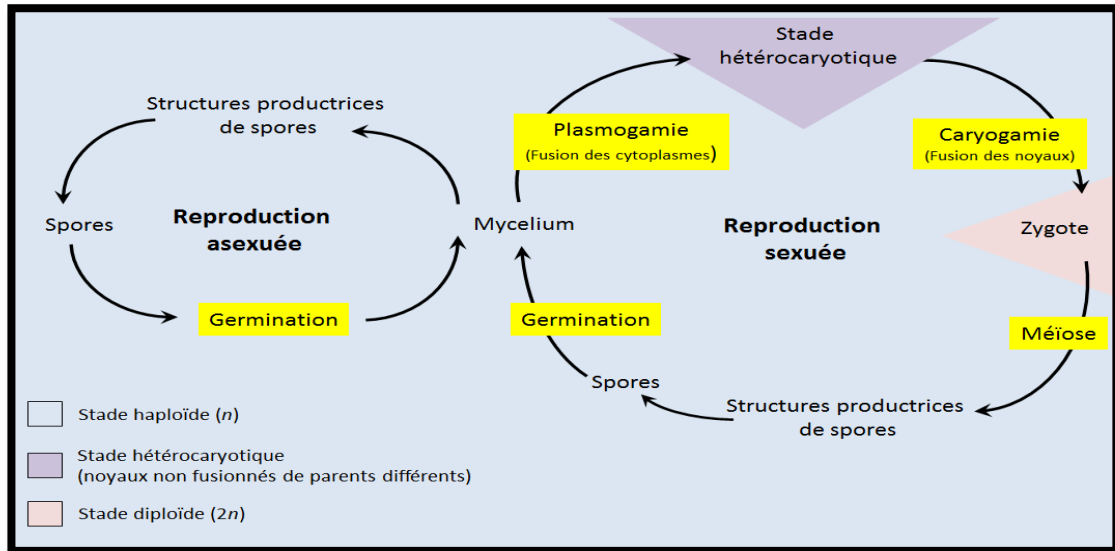


Figure 04 : Reproduction chez les champignons.

I.2. Champignons marins

La présence de champignons dans la mer est connue depuis longtemps puisque le premier spécimen décrit a été découvert en 1869 par C. Durieu de Maisonneuve et J.C.F. Montagne (Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979). Quelques travaux de la première moitié du siècle avaient signalé l'existence de champignons saprophytes dans l'environnement marin (Sparrow, 1934). Il a fallu attendre 1944 pour que la mycologie marine puisse prendre un véritable envol avec la parution des travaux de Barghoom et Linder, premier ouvrage descriptif important présentant un grand nombre d'espèces marines.

I.2.1. Définition

Définir les champignons marins n'est pas chose simple. Plusieurs définitions ont été données, évoluant au cours du temps, se basant à la fois sur des critères physiologiques et/ou écologiques. En 1959, Gold se basait sur des critères physiologiques en considérant que la salinité nécessaire pour obtenir un optimum de croissance et la reproduction du champignon représentait un critère suffisant pour une bonne définition. Kohlmeyer (1963), considère qu'un champignon est marin s'il est capable de se développer et de se reproduire en milieu marin. Il exclut alors ceux qui se développent normalement sur terre et dont des propagules peuvent se retrouver en milieu marin, sans pour autant s'y être développées. Kohlmeyer et Kohlmeyer affinent cette définition en 1979 et considèrent qu'il n'est pas possible de définir les champignons marins uniquement sur des critères physiologiques. Une définition écologique semble plus appropriée. Ainsi apparaissent les notions de champignons marins obligatoires et facultatifs.

- **Les champignons marins obligatoires** sont ceux qui se développent et sporulent exclusivement dans les environnements marins et les estuaires.

- **Les champignons marins facultatifs** sont ceux qui, provenant des habitats terrestres et des milieux aquatiques d'eau douce, sont capables de se développer et éventuellement de sporuler dans le milieu marin.

Le critère de validité pour qu'un champignon soit considéré comme marin serait sa faculté de germer dans les conditions marines naturelles. Tant que sa pousse dans l'environnement marin n'a pas été démontrée, une souche ne peut pas être qualifiée de marine.

I.2.2. Rôle des champignons en milieu marin

D'un point de vue biologique, les trois grandes catégories terrestres : parasites, symbiontes et saprophytes, se retrouvent en milieu marin.

Ainsi, les champignons peuvent être **parasites** de végétaux, tels que des algues, ou d'animaux, les poissons notamment. C'est le cas en particulier des Saprologniales, champignons peu évolués qui ne peuvent se reproduire qu'en milieu aquatique. Ils sont aussi capables de former des associations **symbiotiques** lichénoïdes avec des algues. Ils peuvent enfin vivre en **saprophytes** et jouer ainsi un rôle important dans la dégradation des végétaux marins, mais aussi de ceux provenant du milieu terrestre, en particulier des débris de bois comme l'ont montré Kohlmeyer et Kohlmeyer (1979) qui ont isolé de nombreux champignons lignicoles.

D'autres saprophytes, les champignons arénicoles, vivant dans les espaces entre les grains de sable, sont capables de dégrader la cellulose, les alginates, l'agar , ce dont les animaux de la faune interstitielle ne sont pas capables. De ce fait les saprophytes jouent un rôle important dans la chaîne alimentaire (Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979). Ils participent donc considérablement au renouvellement du matériel et de l'énergie de leur environnement. Ils sont eux-mêmes utilisés par d'autres organismes marins comme source nutritive (Liberra *et al.*, 1995).

I.2.3. Champignons marins et activité biologique

La biologie marine a connu un essor considérable depuis quelques dizaines d'années, permettant ainsi l'isolement de plus de 6000 composés nouveaux (Davidson, 1995).

Dans un premier temps les micro-organismes marins avaient été négligés, mais ils sont désormais considérés comme des sources potentielles de composés biologiquement actifs originaux. Ainsi, en particulier, les champignons issus du milieu marin font actuellement l'objet de recherches approfondies pour la production de métabolites secondaires à activité biologique et pharmacologique. Les travaux portent sur des molécules actives produites tant par des champignons strictement marins, que par des micromycètes déjà connus en milieu terrestre, mais qui, dans le cadre de l'étude, ont été isolés de l'environnement marin et cultivés en milieu marin

naturel ou artificiel. Cent soixante dix huit (178) molécules ont déjà été décrites, dont 124 pour la première fois. Des structures chimiques diverses et parfois originales ainsi que des effets biologiques très variés ont été observés (Verbist et *al.*, 1998).

Une nette prédominance de composés à activité antibactérienne, antifongique et cytotoxique avait été précédemment soulignée (Liberra et *al.*, 1995).

Cependant, sauf dans quelques cas, il n'est en général pas question, à proprement parler, de mycotoxines qui sont généralement produites par des moisissures saprophytes.

I.3. Moisissures et mycotoxine

I.3.1. Généralités

Certaines moisissures sont capables de produire des toxines (mycotoxines) qui peuvent être à l'origine de contaminations des aliments et, par voie de conséquence, responsables d'intoxications humaines ou animales. Du fait de cet impact sur la santé publique et de ses conséquences économiques, la recherche sur les mycotoxines est importante et la littérature volumineuse. La définition des mycotoxines la plus couramment admise par la communauté scientifique est celle de Bennett (1987) :

«Les mycotoxines sont des substances naturelles produites par des champignons qui entraînent une réponse toxique lorsqu'elles sont administrées à faibles doses par une voie naturelle à l'homme et à l'animal.»

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires qui ne sont donc pas synthétisés tout au long du cycle biologique des champignons, mais surviennent généralement en fin de croissance active, lorsqu'un ensemble de conditions est réuni (concentration suffisante de précurseurs, synthèse des enzymes nécessaires en particulier). Elles peuvent ensuite être excrétées dans le milieu extérieur. Elles n'appartiennent pas à une classe chimique définie et sont souvent élaborées en familles de produits.

Elles regroupent donc un ensemble de molécules d'une grande diversité structurale aux effets biologiques variés (Le Bars et Le Bars, 1988). La production de mycotoxines par les moisissures ou mycotoxinogénèse dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques (Le Bars et Le Bars, 1988) :

- **Facteurs intrinsèques** : A l'inverse des métabolites primaires, la distribution des mycotoxines n'est pas universelle, mais limitée à un nombre restreint d'espèces, parfois à une seule espèce, voire à une seule souche (Le Bars et Le Bars, 1988).

D'autre part, la plupart des mycotoxines peuvent être produites par plusieurs espèces de champignons d'un même genre, par exemple les aflatoxines sont produites par trois espèces proches d'*Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus* et *A. nomius*). D'autres mycotoxines sont produites

par des champignons appartenant à des genres différents. Ainsi la patuline est produite par un grand nombre d'espèces appartenant aux genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Paecilomyces* (Frisvad et Samson, 1989).

-Facteurs extrinsèques : Outre des facteurs directement relatifs à l'espèce ou même à la souche, des facteurs extrinsèques sont hautement impliqués dans la toxino-génèse. En effet, la mycotoxino-génèse, de même que la croissance des moisissures, est largement dépendante des facteurs environnementaux avec, pour la mycotoxino-génèse, des limites généralement plus étroites que pour le développement du champignon (Frisvad et Samson, 1989, Le Bars et Le Bars, 1988).

- Température

Les champignons sont généralement mésophiles. Leur croissance hyphale est optimale entre 20 et 25°C, elle est souvent faible à 5 et 35°C. Les conidies des espèces mésophiles ne germent pas en dessous de 5°C mais restent viables très longtemps, et des températures inférieures à -20°C ne tuent pas les conidies.

Nombreuses moisissures nuisibles notamment *Penicillium expansum*, *P.verrucosum*, *P. viridicatum* sont psychrotrophes. Elles peuvent se développer lentement à des températures inférieures à 4°C. Ces champignons sont fréquemment impliqués dans l'altération d'aliments conservés au froid. Les carcasses de viandes fraîches stockées trop longtemps en chambre froide sont recouvertes de colonies fongiques polychromes parmi lesquelles *Cladosporium herbarum* est l'espèce prédominante.

-pH

Concernant le pH, les champignons sont encore beaucoup plus tolérants que les bactéries alors que ces dernières exigent souvent des pH compris entre 7 et 8. La plupart des champignons se développent normalement à des pH compris entre 3 et 8, leur croissance optimale étant généralement obtenue pour des pH compris entre 5 et 6. En raison de leur acidité (pH < 6) de nombreux aliments tels que les légumes, les fruits et la viande sont beaucoup plus exposés à une altération fongique que bactérienne.

-Tension d'oxygène

Sans exception, les moisissures ont besoin d'oxygène pour une croissance normale. Mais pour beaucoup d'entre elles, le développement n'est pas ou peu affecté par des teneurs 10 fois plus faibles (2,1%) que celles de l'atmosphère. *Byssoschlamys fulva* et *B. nivea* peuvent même pousser avec 0,27 % d'oxygène. Les denrées conditionnées sous faible tension d'oxygène ne sont donc pas à l'abri des moisissures.

-Disponibilité en eau

L'humidité favorise le développement des moisissures. Pour son maintien le mycélium doit trouver de l'eau libre (disponible) pour poursuivre sa croissance. Dans les graines, les moisissures utilisent la vapeur d'eau présente dans les interstices entre les grains dont la concentration est déterminée par l'équilibre entre l'eau libre contenue dans le grain (la teneur en eau du grain) et l'eau présente sous forme de vapeur autour du grain. La concentration de l'eau interstitielle est désignée par l'activité de l'eau (a_w). Sans eau libre il ne peut y avoir diffusion des exo-enzymes fongiques dans l'environnement jusqu'au substrat; ensuite, après la dépolymérisation du substrat, il peut y avoir diffusion des molécules simples à l'intérieur de la cellule fongique. Ce paramètre peut varier de 0 (pour des substrats dans lesquels toute l'eau est retenue) à 1 (pour des substrats dont toute l'eau est disponible). Les valeurs caractéristiques de ce facteur permettant le développement des moisissures s'échelonnent de 0,70 à 0,99. Les activités en eau inférieures à 0,60 ne sont pas compatibles avec la croissance fongique mais elles ne tuent pas les conidies. Le chocolat, les épices, les aliments déshydratés (ou peu hydratés), les laits en poudre protégés de la réhydratation sont théoriquement à l'abri d'une altération fongique.

I.3.2. Nature et origine des mycotoxines

À ce jour, 300 à 400 mycotoxines sont connues (Pamel et *al.*, 2010). Il s'agit de petites molécules peu solubles dans l'eau, peu volatiles et difficilement métabolisées par les organismes vivants. Elles sont très stables à l'acidité et à la chaleur (Ruppel et *al.*, 2004). L'origine chimique des mycotoxines est très diverse, certaines dérivent des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxine, patuline, stérigmatocystine), d'autres des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique) et les derniers sont des dérivés terpéniques (désoxynivalénol, diacétoxyscirpénol, fusarénone,) (Leclerc et *al.*, 2005).

I.3.3. Effets des mycotoxines

Les mycotoxines constituent un danger imminent qui tire le signal d'alarme, en raison des pertes économiques importantes qui sont liées à leurs effets sur la santé de l'homme, sur la productivité animale et sur le commerce national et international. La FAO estime que plus de 25 % des récoltes mondiales sont significativement contaminées par des mycotoxines (Krska, 2009). L'ingestion d'aliments contaminés par les mycotoxines peut être à l'origine de toxicités aiguës ou chroniques nommées mycotoxicoses. Cependant, les intoxications aiguës sont rares, spécifiquement chez l'homme, en raison des faibles quantités pouvant être ingérées avec des aliments contaminés. Mais, l'intoxication chronique est souvent à craindre et ce, à cause de l'effet cumulatif des doses fixées sur des organes cibles, tels que le foie ou le rein (Leclerc et *al.*, 2005).

Les mycotoxines peuvent aussi avoir des effets carcinogènes, mutagènes, tératogènes et immunosuppresseurs (tableau 01). En outre, certaines mycotoxines peuvent altérer des réactions immunitaires et réduire ainsi, la résistance aux infections. Du coup, il est, maintenant, largement considéré comme leur effet le plus important, surtout dans les pays en développement (Pamel et *al.*, 2010).

Tableau 01: Les principales mycotoxines et leurs effets (Brochard et Le Bâcle, 2009).

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

I.3.4. Moisissures mycotoxinogènes

Les mycotoxines sont produites par de nombreuses moisissures, dotées génétiquement d'un pouvoir toxigène (Reboux, 2006). Plus de 150 moisissures mycotoxinogènes sont connues actuellement, elles appartiennent principalement aux genres *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* (Pamel et *al.*, 2010). Parmi ces genres, seules certaines espèces et parfois, certaines souches au sein d'une espèce, sont capables d'excréter des mycotoxines (Ruppel et *al.*, 2004). Certaines mycotoxines sont étroitement liées à des espèces fongiques spécifiques alors que, d'autres sont élaborées par de nombreuses espèces appartenant à des genres différents (tableau 02). 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 02: Quelques espèces fongiques productrices de mycotoxines (Atoui, 2006).

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

I.3.5. Principales mycotoxines

○ Aflatoxines

Les Aflatoxines sont des métabolites secondaires des moisissures connues pour être hautement toxiques et potentiellement cancérogènes. Elles ont été détectées dans diverses denrées alimentaires et sont actuellement considérées comme l'un des contaminants les plus dangereux de l'alimentation (Smith et al., 1985). La famille des Aflatoxines est produite par les moisissures du genre *Aspergillus* qui se développent comme contaminants dans les grains stockés particulièrement pendant le stockage en milieu humide (Geacintov et al., 2011)(tableau 02) .

○ Ochratoxines

Les Ochratoxines sont des métabolites produits par plusieurs espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* dans le blé stocké (Labbé et al., 2001). La production des Ochratoxines s'effectue même à des températures n'excédant pas 5°C (OMS, 1980) (tableau 02) .

○ Trichothécènes

Les Trichothécènes sont un groupe de mycotoxines produites principalement par le genre *Fusarium* (Placinta et al., 1999). Les trichothécènes sont généralement trouvés dans le monde entier dans les céréales telles que le blé, le maïs, l'orge et l'avoine. Ce sont des métabolites

fongiques connus pour contaminer les grains stockés et d'autres produits agricoles (Ueno, 1977). La production de trichothécènes dépend de la température et de l'activité de l'eau.

- **Zéaralénones**

L'occurrence de ces toxines est favorisée par l'élévation de la teneur en eau et de la diminution de température. Des concentrations élevées de zéaralénones ont été mesurées dans le blé stocké dans des conditions humides (Agag, 2004).

- **Moniliformines**

Certaines espèces de *Fusarium* ont la capacité de produire ce groupe de mycotoxine dans le blé : *Fusarium moniliforme*. L'optimum de cette production est dans les températures chaudes 25-30°C (Xu et al., 2003).

I.4. Infection fongique des poissons d'élevage

L'infection fongique du poisson dépend de plusieurs facteurs, dont le stress, la température de l'eau et l'état physiologique des poissons. Les densités de poissons élevées, les manipulations, la présence d'une maladie primaire et les températures élevées de l'eau favorisent la croissance des champignons. En période de reproduction, bien que les salmonidés soient particulièrement bien protégés contre les infections externes par une couche épaissie de mucus, la présence des hormones sexuelles favorise l'apparition d'infections fongiques (Roberts, 1979).

Les plaques cotonneuses blanches, visibles sur le corps des animaux malades, sont constituées par les filaments mycéliens de divers champignons. Le développement des champignons sur les poissons est vraisemblablement un effet secondaire. En effet, les animaux affaiblis par un processus encore mal défini, perdent leur résistance naturelle, déjà réduite au moment du frai, et deviennent sensibles aux différents éléments pathologiques présents dans l'environnement. Les mycoses semblent irréversibles en milieu naturel. Les poissons sont condamnés à périr à plus ou moins longue échéance, dès l'apparition des premières atteintes mycéliennes. Les champignons mis en évidence sur les poissons sont présents dans l'environnement (eau, sédiments, végétation) (Baudouy, 1973).

Les mycotoxines, produites par divers mycètes ou champignons des genres *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*, peuvent contaminer facilement les céréales, leurs sous-produits et les produits d'origine végétale et animale qui entrent dans la composition des aliments industriels ou de fabrication artisanale destinés à la pisciculture. Les plus communes sont les aflatoxines, l'ochratoxine A, la zéaralénone et les trichothécènes. Cependant, les informations sur l'impact des mycotoxicoses sont assez rares et la plupart des informations proviennent d'études expérimentales. Les effets toxicologiques chez les poissons dépendent du type de mycotoxine et de la relation dose-exposition à laquelle les poissons sont soumis. Dans les intoxications

subchroniques, on observe généralement un arrêt de croissance, des altérations de l'état général, des atteintes d'organes spécifiques impliquant notamment le foie, une immunosuppression combinée à une sensibilité accrue aux agents pathogènes opportunistes et, pour les aflatoxines, une incidence élevée des tumeurs hépatiques. Toutefois, des variations importantes de la toxicité sont liées à divers facteurs, en particulier l'espèce et l'âge du poisson (Caruso, 2013). Par exemple, l'aflatoxine B1, l'une des plus courantes, est rapidement excrétée par le poisson-chat américain (*Ictalurus punctatus*) mais pas par la truite arc-en-ciel (*Onchoryncus mykiss*), qui la métabolise en une molécule très toxique. La truite est une espèce très sensible à l'AFB1, tandis que le saumon coho (*Oncorhynchus kisutch*), la carpe, le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) ou le poisson-chat américain ont une sensibilité moindre. L'amplitude de cette variabilité est donnée par la dose létale médiane (DL50) de l'AFB1 qui est de 0,5 mg/kg pour la truite, mais 200 fois supérieure pour le tilapia du Nil. Diverses études comparatives ont permis d'expliquer les raisons de ces variations (Santacroce et al., 2008).

Partie II : Généralités sur l'*Artemia*

II.1. Répartition géographique de l'*Artemia*

II.1.1 *Artemia* dans le monde

L'*Artemia* occupe des biotopes à climat tropical, subtropical ou tempéré (Lavens et Sorgeloos, 2000). La diversité écologique de ces biotopes isolés et la flexibilité génétique de l'espèce ont mené à l'existence de plus de 350 populations (Van stappen et Sorgeloos, 1993). L'*Artemia* est considéré comme un organisme euryhalin et eurytherme rencontré à des salinités entre 80 et 220 g/l selon les populations et les espèces. De ce fait, les différentes populations d'*Artemia* sont rencontrées dans plus de 500 lacs salés naturels et artificiels appelés Chott, Sebkhah ou saline qui sont repartis sur toutes les zones climatiques tropicales, subtropicales et tempérées (Fig. 05).

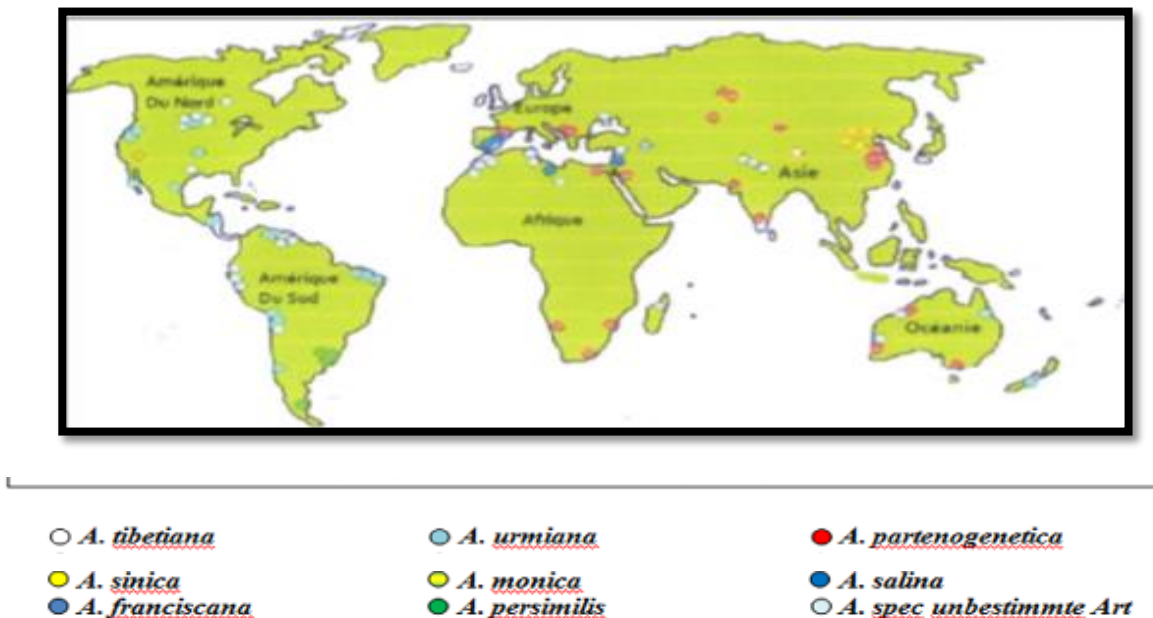


Figure 05: Répartition de l'*Artemia* dans le monde (Lavens et Sorgeloos, 2000).

II.1.2. *Artemia* en Algérie

D'après Haddag (1991) et Kara (1994), les travaux réalisés sur l'*Artemia*, en Algérie sont peu nombreux, l'espèce se rencontre dans les chotts et sebkhas, et à l'état actuel, aucun site en Algérie ne fait l'objet d'une exploitation. Néanmoins, Kara et Amrouayache (2012) ont recensé 11 sites potentiels de présence d'*Artemia* en Algérie (Tableau 03).

Tableau 03 : Les sites potentiels d'*Artemia* connus en Algérie (Kara et Amarouayache, 2012).

Région	Superficie (ha)	Coordonnées géographiques	Espèce	Références
Sebkhât Oran	43,000	35°43'N 00°08'W	Inconnue	Sorgeloos et <i>al.</i> , 1986 ; Ghomari et <i>al.</i> , 2011
Chott Ouargla	6,853	31°57'N 05°20'E	Inconnue	Sorgeloos et <i>al.</i> , 1986
Chott Marouane (El Oued)	36,000	34°03'N 06°20'E	<i>A. Salina</i>	(Sorgeloos et <i>al.</i> , 1986 ; Zemmouri, 1991 ; Kara et <i>al.</i> , 2004 ; Samraoui et <i>al.</i> , 2006 ; Amarouayache et <i>al.</i> , 2009 ; Amarouayache et Kara, 2010
Sebkhât Ez-Zemoul (Oum El Bouagui)	6,100	35°53'N- 06°33'E	<i>A. Salina</i>	Sorgeloos et <i>al.</i> , 1986 ; Zemmouri, 1991 ; Kara, 1998 ; Samraoui et <i>al.</i> , 2006 ; Amarouayache et Kara, 2010 ; Amarouayache et <i>al.</i> , 2010 ; Amaraouayache et <i>al.</i> , 2012.
Arzew Saltern (Bethioua, Oran)	2,900	35°41'N- 00°17'W	<i>A. tunisiana</i>	Zemmouri, 1991 ; Haddag, 1991 ; Samraoui et <i>al.</i> , 2006, Ghomari et <i>al.</i> , 2011
Garaet El Tarf (Oum El Bouagui)	33,460	35°42'N 07°07'E	<i>A. Salina</i>	Haddag, 1991 ; Kara, 1998 ; Gagneur et Kara, 2001 ; Ghomari et <i>al.</i> , 2011
Chott	48,000	34°10'N	<i>A. Salina</i>	Samraoui et <i>al.</i> , 2006 ;

Melghir (Biskra)		06°17'E		Ghomari et al., 2011
Sebkhat Sidi Bouziane (Relizane)	1,740	35°50'N 00°39'W	<i>A. Salina</i>	Zemmouri, 1991 ; Ghomari et al., 2011
Lac El- Bahira (Setif)	10	35°50'N 05°15'E	Inconnue	Sorgeloos et al., 1986 ; Derbal et al., 2010, Ghomari et al., 2011
Lac salé de Goléa (Ghardaia)	18,947	30°28'N 02°55'E	Inconnue	Ghomari et al., 2011
Dayet Morseli (Oran)	150	35°30'N 00°46'W	Inconnue	Sorgeloos et al., 1986

II.2. Systématique, biologie et écologie de l'*Artemia*

II.2.1. Définition d'*Artemia*

L'*Artemia* est un petit crustacé aquatique de forme allongée et dépourvu de carapace, il connaît 14 mues, sa coloration va du blanc laitieux au bleu vert jusqu'au rouge brique et au vermillon selon sa nourriture et le milieu, en particulier selon la teneur en oxygène dissout (Fig.06).



Figure 06: *Artemia salina* adulte (Mioara Dumitrascu, 2011).

II.2.2. Classification systématique

Jusqu'à assez très peu de temps, on dénommé à toutes les populations d'*Artemia* du monde comme *Artemia salina*. Actuellement, il a été démontré l'existence de plusieurs espèces dans le genre *Artemia*, qui regroupe des souches diploïdes, avec des individus de sexes séparés, et des souches haploïdes parthénogénétiques (asexuées). Les souches bisexuées existent préférentiellement dans les latitudes tempérées (entre 25 et 40°C), alors que les souches asexuées (composées exclusivement par des femelles) sont rencontrées seulement en Asie et en Europe, préférentiellement dans les basses et hautes latitudes (des températures < à 25°C et > à 40°C dans les 2 hémisphères). La classification systématique de l'*Artemia* jusqu'au niveau du genre est donnée par (Flössner, 1972).

Règne: Animal.

Embranchement: Arthropodes.

Classe :Crustacea.

Sous classe :Branchiopode.

Super Ordre: Anostracés.

Famille :Artemiidae.

Genre: *Artemia* leach, 1819.

Les observations d'un grand nombre de populations nouvellement découvertes, ont donné un nombre de noms spécifiques très important. Dès le début du 20ème siècle, des études cytologiques et génétiques ont complété les méthodes traditionnelles de classification basées classiquement sur les aspects morphologiques. Et comme résultat, neuf souches-soeurs d'*Artemia* bisexuées et qui sont :

- *Artemia salina* (Linnaeus, 1758) à Lymington, Angleterre (actuellement extincta).
- *Artemia tunisiana*, Europa et le Nord Africain.
- *Artemia franciscana* (Franciscana Kellogg, 1906) en Amérique (Nord, Centre et Sud).
- *Artemia persimilis* (Piccinelli et prosdocimi, 1968) en Argentine.
- *Artemia urmiana*, Iran.
- *Artemia franciscana monica* (Verrill, 1869) au niveau du Lac Mono, Californie-USA.
- *Artemia urmiana* (Gunther, 1900).
- *Artemia sinica* (Yaneng, 1989).
- *Artemia parthénogénétique* (Barigozzi, 1974).

Plusieurs populations parthénogénétiques sont connues en Europe et en Asie. En raison des importantes différences entre ces populations, (par exemple le nombre de chromosomes), il est

difficile de justifier leur articulation dans la classification taxonomique comme une septième espèce soeur la « *Artemia parthénogénétique* ».

II.2.3. Reproduction d'*Artemia*

La femelle pond des oeufs de durée qui s'accumulent sur les berges de ces étendue d'eaux salées (grands lacs salés, salines, etc...). Ces oeufs ou cystes, renferment un embryon quasi déshydraté au stade gastrula, et constituent une forme de résistance particulière; ils peuvent rester au sec pendant longtemps, (état de diapause) (Gilbert,1991). La femelle adulte a un sac ovigère, en forme de coeur à l'arrière de ses derniers appendices. Le mâle, quant à lui, possède deux appendices symétriques en forme de châte à hauteur de la tête, il s'en sert enlacer fermement la femelle et passe des jours accroché à elle, (Fig. 07). Il est généralement plus petit que la femelle, nage plus rapidement, mange moins et est moins coloré.

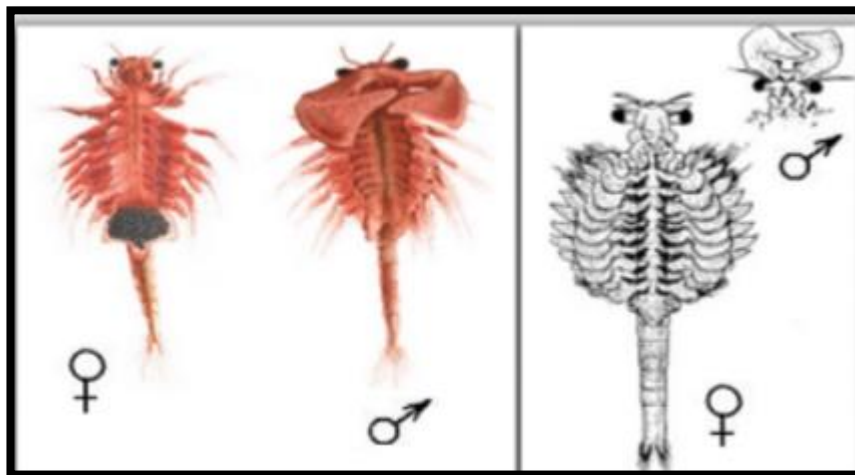


Figure 07 : Mâle et femelle d'*Artemia* (Abatzolulos et *al.*, 2010).

II.2.4. Régime alimentaire

On l'alimente avec sa nourriture naturelle la plus adaptée, c'est-à-dire le phytoplancton vivant, constitué d'algues microscopiques. *Dunaliella Salina* est la souche de phytoplancton la plus utilisée, car cette espèce est relativement facile à cultiver et est de plus, une nourriture considérée comme bonne qualité. Si le milieu est pauvre en nourriture, la croissance de l'*Artemia* sera lente et une forte mortalité sera observée (Kellog, 1906).

II.3. Types d'*Artemia*

II.3.1. *Artemia franciscana*

Est la préférée parmi toutes les espèces en aquarium, en aquariophile et en aquaculture de poissons ornementaux. C'est même, la seule souche qui est exploitable en remplacement d'autres nourritures planctoniques en élevage de poissons marins comme le poisson-clown. La caractéristique première d'*Artemia franciscana*, est sa taille, tant sa longueur que son envergure

générale: elle est d'environ 20% plus petite que d'autres espèces particulièrement bien connues (Hfath,1924).

II.3.2. *Artemia salina*

Fait partie de l'ordre des branchiopodes, elle a le corps allongé, presque filiforme, d'une mollesse extrême et dépourvue de tête. Sa couleur varie du blanc-jaunâtre au rouge ferrugineux (Joly, 1840).

II.4. Morphologie et cycle de vie d'*Artemia salina*

II.4.1. Morphologie de l'espèce

On distingue 3 parties (Fig. 08):

1. La tête

Renferme un œil nauplien médian, une paire d'yeux latéraux pédonculés et un simple cerveau en forme d'anneau comme une structure autour de la bouche. A sa partie antérieure, il y a une paire d'antenne courbée portant à leurs extrémités trois petites soies et une seconde paire d'antennes, plus développées, constituant un caractère de dimorphisme sexuel ; chez le mâle, les antennes forment une grosse pince avec deux épines qui servent à saisir la femelle lors de l'accouplement, alors que chez la femelle, elles sont beaucoup plus réduites. Sur la tête se trouve la cavité buccale qui est représentée par un large labrum, une paire de mandibules et deux paires de maxillaires. Ces diverses pièces constituant la cavité buccale sont reliées à l'œsophage qui aboutit dans l'estomac.

2. Le thorax

Est composé de 11 segments, chaque segment porte une paire d'appendices natatoires foliacés (Haddage, 1991).

3. L'abdomen

Il est composé de huit segments: les 2 premiers segments dit génitaux (deux pénis chez le mâle/la poche incubatrice des femelles); le dernier segment abdominal porte deux appendices portant de longues soies. Entres ces appendices se trouve l'anus (Dhont et Van stappen, 2003).

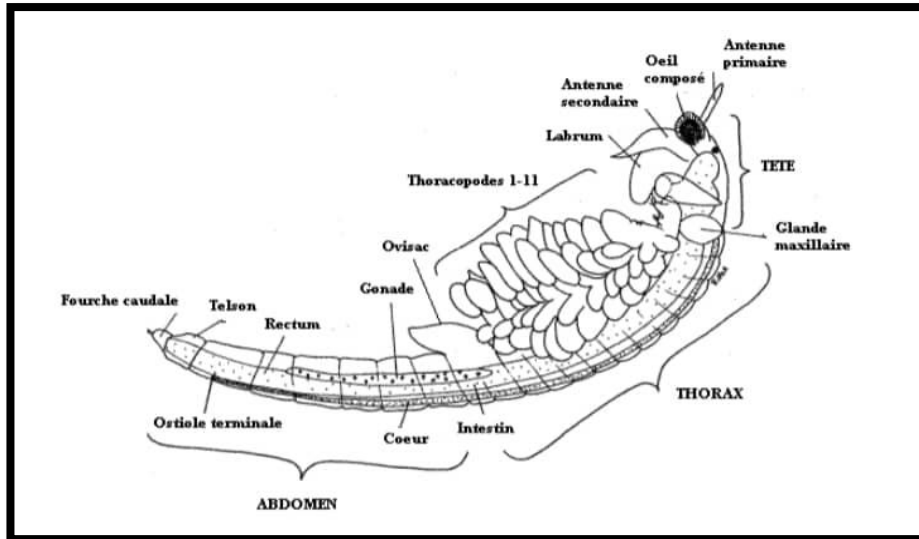


Figure 08 : La morphologie d'Artemia (Femelle adulte, vue latérale).

II.4.2. Cycle de vie

Selon les conditions environnementales, sont produits deux types d'oeufs. Dans les conditions optimales de disponibilité d'aliment, salinité et oxygène, et selon l'espèce, l'éclosion des oeufs se fait dans l'utérus et sont libérés sous forme de nauplius, aussi connues sous le nom « d'oeufs d'été » (reproduction ovovivipare) (Fig. 09). Et en face des conditions adverses (salinité élevée, ou niveaux faibles d'oxygène), ils sont produits des formes d'oeufs de résistances connues sous le nom de cystes, ou aussi appelés « des oeufs d'hiver » (Curto E. D, 2006).

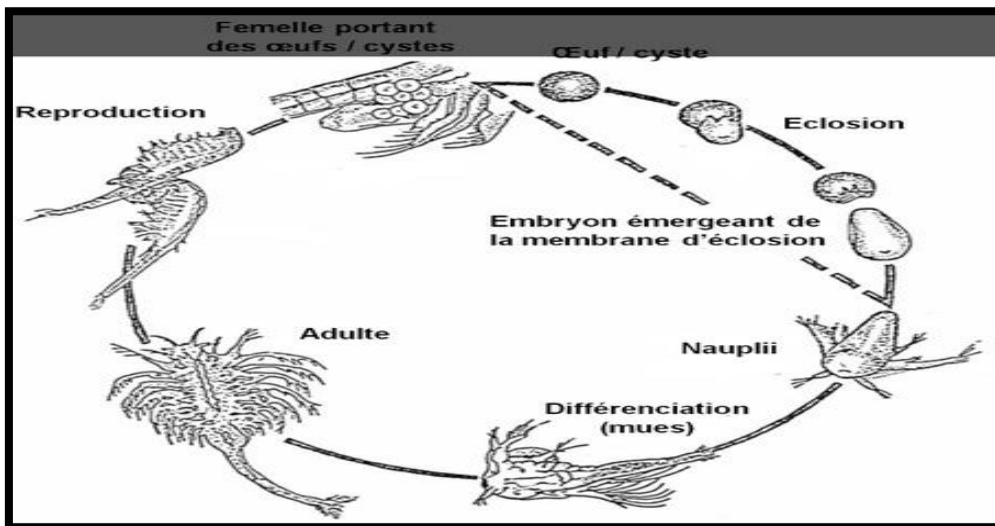


Figure 09: Cycle de vie de l'Artemia salina (Defaye et al., 1998).

II.4.3. Nauplius

Les nauplii d'Artemias sont de petits crustacés qui peuvent vivre dans les eaux douces comme ils peuvent vivre dans des eaux saumâtres, ces petites créatures peuvent résister à des taux

de salinité extrêmes (jusqu'à près de 350 g/l) qui interdisent le développement de tout autre organisme animal. La taille des nauplies *d'Artemia* n'excède pas les treize millimètres, elle sont largement utilisées comme première nourriture pour les alevins. et sont aussi utilisées comme supplément pour nourrir les adultes et les "inciter" à se reproduire.

II.4.4. Cyste

Le cyste (Fig.10) à une forme biconcave, après hydratation il devient sphérique, le cyste sec résiste également aux fortes radiations, une variété de solvants organiques (même à des pesticides), le manque d'oxygène et peut être entreposé pendant des mois ou des années sans toutefois perdre sa capacité d'éclosion (Granvill et Treece, 2000).

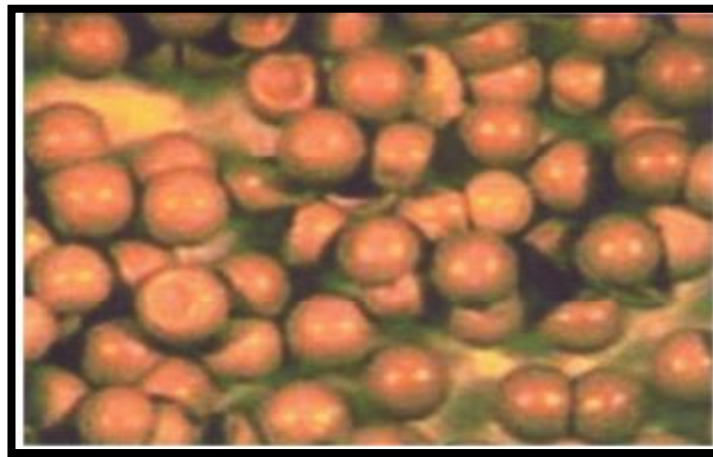


Figure 10 : Cyste *d'Artemia* (Dahloum, 2007).

II.4.5. Structure de cyste d'*Artemia*

L'enveloppe du cyste est constituée de 03 structures:

1. **Le chorion:** il est constitué essentiellement de lipoprotéines, sa fonction est la protection de l'embryon.
2. **La cuticule membranaire:** elle protège l'embryon contre l'agression de grosses molécules (CO₂) il sert en fait de filtre de perméabilité.
3. **La cuticule embryonnaire:** c'est une membrane très élastique et transparente qui sépare l'embryon de la cuticule membraneuse (Dhont et Vanstappen, 2003) (Fig.11).

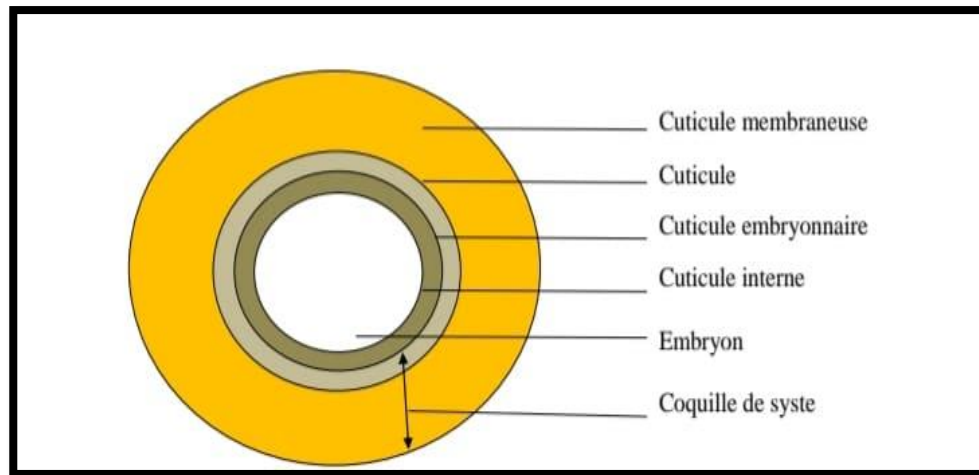


Figure 11 : Structure de cyste de l'*Artemia* (Dhont et Van Stappen, 2003).

II.5. Conditions de formation des cystes

Les conditions qui favorisent la formation des cystes sont: Haute salinité, Manque chronique d'aliment, Stress dû au manque d'oxygène (l'oxygène inférieur de 2mg/l) (Madani ,2001).

II.6. Conservation et éclosion des cystes

II.6.1. Conservation

Bien que déshydratés, les cystes présentent un faible métabolisme qu'il sera nécessaire de diminuer voire éliminer pour assurer une conservation de plusieurs années sans chute du taux d'éclosion.

Les cystes devront être maintenus déshydratés, à basse température et surtout à l'abri de l'oxygène (Bowen, 1963 ; Clegg et Cant, 1980).

Suivant la durée de conservation désirée, on peut utiliser diverses méthodes. Pour quelques mois, les cystes peuvent être placés directement dans la saumure saturée. Si le stockage doit se prolonger ils doivent être déshydratés dans une étuve puis placés sous vide ou en atmosphère inerte (azote).

II.6.2. Eclosion

Au niveau des éclosions, étant donné le prix actuel des cystes, l'impératif sera de réaliser des éclosions où le rapport poids de naüplii obtenus sur poids de cystes soit le plus haut possible. Pour une éclosion optimale certains critères de base devront être observés en les adaptant à la souche utilisée.

II.7. Paramètres de la qualité de l'*Artemia*

La caractérisation de la qualité de l'*Artemia* est déterminée par l'étude de plusieurs paramètres qui se résument sous trois volets : la qualité d'éclosion des cystes d'*Artemia*, la biométrie des cystes et nauplii et la valeur nutritionnelle.

Après 8 heures environ, le nauplius subit une première mue pour se transformer en larve « méta nauplius » à ce moment, le tube digestif devient fonctionnel, la bouche et l'anus sont également ouverts. A l'aide de ces antennules, l'animal peut ainsi ingérer des petites particules alimentaires d'une taille ne dépassant pas 50µm. Ensuite la larve se développe et se différencie suivant une série de dix-sept mues : un stade « nauplius » quatre « méta- nauplius », sept « post-méta-nauplius » et cinq stades « post-larvaire » (Henstschel, 1968 ; Schehardt, 1987).

À partir du dixième stade, d'importantes transformations morphologiques et fonctionnelles se mettent en place. On assiste à l'élancement et à une segmentation prononcée du corps de la larve, ainsi les huit premières paires de pattes thoraciques (thoracopodes) se forment en entraînant une progression plus soutenue de celle-ci à ce moment, les yeux complexes se pigmentent et la larve atteint environ une taille de 1.4 mm.

Par ailleurs, les antennes perdent leur fonction de locomotion et subissent une différenciation sexuelle (Dhont et Van Stappen, 2003).

Le développement des thoracopodes se poursuit et d'autres paires de thoracopodes continuent à se développer, en même temps apparaissent les premiers segments abdominaux, on distingue : Les télopodites et les endopodites (locomotion et filtration de la nourriture), ainsi que les exopodites (ouïes et respiration).

II.8. Intérêt de l'*Artemia*

L'intérêt principal pour l'aquariophilie, de l'*Artemia salina* est sa larve ou nauplius. Sa taille en fait un mets de choix pour les alevins, et pour les adultes de certaines espèces. Sa richesse en élément nutritifs, permet une croissance optimale.

II .9. Utilisation d'*Artemia*

II.9.1 . Applications d'*Artemia* pour alimenter les différentes espèces en aquaculture

a. Crevette d'eau douce

Les nauplii d'*Artémia* est le régime le plus utilisé et le plus efficace pour l'élevage larvaire des crevettes d'eau douce. Contrairement aux pénéidées, *Macrobrachium* peut d'abord être alimenté avec les nauplii d'*Artemia* fraîchement éclos à des densités supérieures à 0,1 nauplii / ml (Janat et al., 1986).

b. Poissons marins

Les larves de nombreuses espèces de poissons marins, tels que la daurade, mérour, et le turbot, ne peuvent pas être nourris avec un régime d'*Artemia*. Il faut une période initiale d'alimentation sur une proie plus petite, comme le rotifère *Brachionus plicatili*. Cependant, contrairement aux larves des crustacés, des larves de poissons de mer sont habituellement cultivés sur *Artemia* pendant une période beaucoup plus longue, (ex. de 20 à 40 jours).

En conséquence, la consommation de cyste d'*Artemia* peut être parmi la plus haute dans la larviculture de poissons de mer, s'étendant de 200 à 500 g par 1000 alevins produits. Généralement les nauplius instar I enrichies sont donnés comme aliments aux plus grandes proies pendant plusieurs jours comme transition au régime de rotifère (Webber et Sorgeloos, 1980).

L'application d'un régime d'*Artemia* enrichis en acides gras hautement insaturés (HUFA) à un effet significatif dans la larviculture de poissons marins, elle entraîne une augmentation de la survie et la réduction de la variabilité de la production de poissons d'élevage. En plus, la qualité des alevins en termes de résistance au stress, et de pigmentation est meilleure.

c. Poissons d'eau douce

La larviculture de poissons d'eau douce est souvent effectuée dans les étangs avec le zooplancton normal comme nourriture larvaire. Les salmonidés, peuvent-être le groupe le plus largement cultivés sur une base intensive, ont une région digestive relativement bien développée à la première alimentation, et sont habituellement alimentés par des régimes formulés dès le commencement de l'alimentation. Néanmoins, beaucoup d'espèces de poissons d'eau douce sont alimentées par *Artemia*. Les larves de brochets (*Stizostedion vitreum*) sont développées sur des régimes d'*Artemia*

Un inconvénient majeur dans l'alimentation des organismes d'eau douce avec *Artemia*, c'est qu'elles meurent après 30 à 60 minutes dans l'eau douce. En conséquence, elles ne sont pas en permanence à la disposition du prédateur comme elles le seraient dans des systèmes marins, et les prédateurs doivent donc être alimentés toutes les 2 à 3 heures (Sorgeloos et Coutteau, 1994).

d. Poissons d'aquarium

Les *Artemia* adultes vivants et congelés sont utilisés comme aliments pour les espèces de poissons d'aquarium. Les cystes sont également achetés par ces utilisateurs qui les font éclore pour produire des nauplius.

e. Autres utilisations

L'*Artemia* est très sensible à la moindre trace d'élément toxique (métaux lourds, dioxine, pesticides). L'*Artemia* est donc idéal pour des tests de toxicités.

Dans le future, la biomasse d'*Artemia* pourrait être considérée comme source complémentaire des protéines animales pour les animaux terrestres de même que pour l'homme (Webber et Sorgeloos, 1980 ; Janat et *al.*, 1986). L'idée de l'utilisation d'*Artemia* comme source alimentaire pour l'homme est particulièrement intéressante pour les pays en développement où les protéines animales sont rares alors que les sites potentiels de production d'*Artemia* sont abondants (Sorgeloos et *al.*, 1986)

II.10. *Artemia* en éco-toxicologie

Le choix du modèle animal en éco-toxicologie devrait prendre en compte les aspects de sa biologie, une large distribution géographique avec une haute adaptabilité aux conditions environnementales défavorables, une culture de laboratoire relativement simple, et entretien facile, une résistance à la manipulation, un cycle de vie court avec une grande production de progéniture et surtout l'existence d'une base d'informations sur l'espèce cible. De ce fait, l'utilisation d'*Artemia* en éco-toxicologie, satisfait toutes ces exigences en rendant réalisable un développement durable des essais biologiques à base d'*Artemia* (Blaise, 1998). Les caractéristiques intrinsèques de ce genre le transforment en un organisme approprié. Pour une utilisation en éco-toxicologie, garantissant la fiabilité, la faisabilité et la rentabilité dans l'éco-toxicité de routine et / ou de recherche les pratiques, il présente alors :

- Cycle de vie court,
- Forte fécondité, bisexuel avec une stratégie de reproduction parthénogénétique (avec production de naupliis ou de kystes),
- Petite taille du corps et adaptabilité à un nutriment varié, car il s'agit d'un alimentateur de filtre non sélectif.

1. Souches de champignons étudiées

Afin d'étudier le potentiel toxique des champignons issus de poissons d'aquaculture, 25 souches isolées de deux espèces de poissons à savoir: daurade royale (*Sparus aurata*) et le bar commun ou loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) ont été fournies et identifiées par Madame N. Benmessaoud du laboratoire LRSE (Laboratoire Réseau de Surveillance Environnementale), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella. La liste de ces souches est donnée sur le tableau 04.

Tableau 04: Souches fongiques sélectionnées.

Souches fongiques	Références
<i>Penicillium sp1</i>	<i>Penlrsp1</i>
<i>Penicillium sp2</i>	<i>Penlrsp2</i>
<i>Penicillium sp4</i>	<i>Penlrsp4</i>
<i>Penicillium sp5</i>	<i>Penlrsp 5</i>
<i>Penicillium sp6</i>	<i>Penlrsp6</i>
<i>Penicillium sp7</i>	<i>Penlrsp7</i>
<i>Penicillium sp8</i>	<i>Penlrsp8</i>
<i>Penicillium sp9</i>	<i>Penlrsp9</i>
<i>Penicillium sp10</i>	<i>Penlrsp10</i>
<i>Penicillium sp11</i>	<i>Penlrsp11</i>
<i>Penicillium sp12</i>	<i>Penlrsp12</i>
<i>Penicillium sp13</i>	<i>Penlrsp13</i>
<i>Aspergillus sp1</i>	<i>Asplrsp1</i>
<i>Aspergillus sp2</i>	<i>Asp flrsp2</i>
<i>Aspergillus sp3</i>	<i>Asp lrsp3</i>
<i>Aspergillus sp4</i>	<i>Asplrsp4</i>
<i>Aspergillus sp5</i>	<i>Asp lrsp5</i>
<i>Aspergillus sp6</i>	<i>Asp flrsp6</i>
<i>Aspergillus sp7</i>	<i>Asp nidlrsp7</i>
<i>Aspergillus sp8</i>	<i>Asp lrsp8</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Asp nlrsp1</i>

<i>Aspergillus sp10</i>	<i>Asp verlrsp10</i>
<i>Alternaria sp1</i>	<i>Alt lrsp1</i>
<i>Alternaria sp2</i>	<i>Alt lrsp2</i>
<i>Alternaria sp3</i>	<i>Alt lrsp3</i>

2. Repiquage et identification des souches sélectionnées

2.1. Repiquage des souches sur milieu sabouraud

Le repiquage consiste à prélever avec une aiguille stérile, un fragment mycélien, à la marge du thalle de chaque souche, et de le transférer sur de la gélose sabouraud contenant un antibiotique : le chloramphénicol, à une concentration de 50 mg/l afin d'éviter la prolifération bactérienne qui pourrait inhiber ou gêner celle des champignons. L'inoculum est mis au centre de la boîte de pétri de 9 cm Ø. Après cette opération, les boîtes sont entourées du papier parafilm et sont mises à incuber à une température de 27°C pendant 8 jours.

2.1.1. Identification

Les souches fongiques repiquées ont été identifiées en se basant sur les observations phénotypiques macroscopiques et microscopiques.

2.1.1.1. Identification macroscopique

Selon Dufresne (2014), l'identification macroscopique repose principalement sur l'observation des critères suivants :

- Couleur de surface, revers et pigments diffusibles;
- Texture: laineuse, duveteuse, poudreuse, glabre.
- Topographie: plat, surélevée, cérébriforme, avec stries radiales;
- Vitesse de croissance.

2.1.1.2. Identification microscopique

L'identification microscopique repose essentiellement sur l'observation de formes végétatives telles que les hyphes (septés ou non septés), les structures de reproduction comme les conidiophores, les cellules conidiogènes, et les conidies (Dufresne, 2013).

Pour réaliser cette identification, la technique du scotch aétechoisie, en appliquant le côté adhésif directement sur la colonie, puis l'étaler sur une lame contenant une goutte de bleu de coton ou de rouge de Congo. La lame est observée au microscope à un grossissement X40.

3. Production des métabolites secondaires sur milieu de fermentation

La production des métabolites secondaires par les souches étudiées a été mise en évidence après une culture sur un milieu de fermentation spécifique à base d'eau de mer et cela pour se rapprocher des conditions du milieu marin (la préparation est en annexe). Le milieu Czapeckdox liquide (CYA) additionné de 2.5% extrait de levure a été choisi comme un milieu idéal pour une production optimale des métabolites secondaires fongiques (Rojas et *al.*, 2005, Pamel et *al.*, 2010). La fermentation a été réalisée dans des erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml du milieu de culture (Czapeckdox liquide), le pH a été ajusté à 5,5 (Tuomi et *al.*, 2001).

3.1. Ensemencement du milieu de fermentation

Après une incubation de 8 jours sur le milieu sabouraud-chloramphénicol, les différentes souches fongiques obtenues ont été ensemencées dans des erlenmeyer de 250 ml contenant 30 ml de PDA gélosé (Fig. 12).



Figure 12 : Les souches après 10 jours d'incubation sur milieu PDA.

Après 10 jours d'incubation à 27°C, les souches étudiées sporulent et leurs spores ont été récupérées par l'ajout de 10 ml d'eau distillée stérile suivie d'une agitation vigoureuse à l'aide d'un barreau magnétique (Rabie et *al.*, 1977) (Fig. 13). Les suspensions sporales obtenues ont été diluées avec de l'eau distillée stérile. Ensuite, la concentration en spores/ml des solutions obtenues a été déterminée à l'aide d'une cellule de Malassez. Des dilutions décimales ont été effectuées pour obtenir une suspension sporale à 10^6 spore/ml (Klich et *al.*, 2000; Seo et *al.*, 2003; Ehrlich et *al.*, 2005). Chaque erlenmeyer contenant le milieu de culture Czapeckdox liquide a été inoculé par 1 ml de la suspension sporale (10^6 spore/ml).

Les erlenmeyerontétéincubés en statique à 27°C, pendant 21 jours et à l'obscurité (Sallenave, 1999) (Fig. 14).

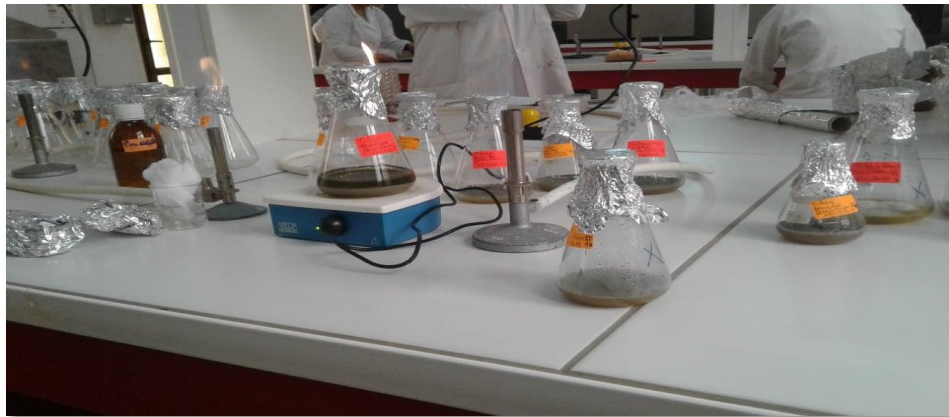


Figure 13 : Agitation vigoureuse à l'aide d'un barreau magnétique.



Figure 14:Les souchesfongiques après 21 joursd'incubation à l'obscurité.

3.2 Filtration à partir du milieu de fermentation

Après 21 jours d'incubation, la biomasse formée a été éliminée en filtrant le milieu CYA à travers du papier filtre type Whatman N° 01(Fig.15).



Figure 15: Obtention du filtrat.

4. Test de toxicité

Le test de toxicité a été réalisé directement sur le filtrat aqueux ainsi obtenu, ce qui présente l'avantage de tester l'ensemble des substances produites

4.1. Test de toxicité aiguë sur les larves d'*Artemia salina*

En premier lieu, nous avons utilisé le test de toxicité aiguë sur larves d'*A. salina*, qui est un test général de toxicité très sensible à divers composés toxiques et en particulier très adapté à la détection des mycotoxines. Il permet donc une première sélection des souches toxigènes. Il présente, d'autre part, l'avantage de pouvoir se réaliser directement sur les filtrats de culture, évitant l'étape longue d'extraction (Sallenave, 1999). Il permet ainsi de tester un grand nombre de souches et l'ensemble des métabolites présents, sans se limiter à ceux qui sont extractibles par les solvants utilisés. Le test de toxicité aiguë sur larves d'*A. salina*, consiste à mettre en contact un nombre donné de larves avec une quantité connue de substance toxique et d'observer leur mortalité au bout de 24 h. Il est le plus souvent réalisé sur des larves au stade II et III. Les larves sont soumises à une gamme de dilutions de l'agent potentiellement toxique en solution dans le milieu. Après 24 h de contact, à l'obscurité, les larves survivantes sont comptées et le résultat obtenu permet le calcul de la concentration létale 50 (CL₅₀), c'est-à-dire la concentration qui entraîne la mort de la moitié des larves de départ.

4.1.1. Eclosions des larves

Les cystes ont été fournies par le laboratoire d'halieutique, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Mostaganem. L'espèce d'*Artemia salina* est d'origine Algérienne, provenant de la saline de Bethioua (Fig. 16).

Situation du secteur d'étude la sebkha d'Oran :

La Sebkha d'Oran est un lac situé à 15 km au sud d'Oran dans la commune de Misserghin et distante de 12 km de la mer Méditerranée. Elle est une dépression, fermée à 110 mètres d'altitude, limitée au Nord par le massif du Murdjajo et au Sud par le massif de Tessala. La sebkha occupe le fond de cette dépression, présente une topographie apparemment plane, mais légèrement inclinée vers l'ouest, avec un point bas à 80 mètres d'altitude, et un point haut à 82 mètres². De forme elliptique,

salongueur, d'orientation approximativesud-ouest/nord-est, est de 40 km, et salargeur



de 6 à 13 km³.

Figure 16: Les cystes d'*Artemiasalina*.

Afin d'assurer une éclosion optimale des cystes, certaines conditions strictes doivent être respectées (Lavens et Sorgeloos, 1996), à savoir: une température maintenue entre 25 et 28°C et une salinité de 15 à 35 g/l avec un pH aux environs de 8.0.

Pour ce fait, selon Granvil et Treece, 2000, il faut alimenter les cystes avec une quantité d'oxygène de 2 mg/l au minimum, de préférence 5 mg/l, et une densité maximale de cystes ne dépassant pas 2g/l afin d'assurer une illumination constante de 1000 à 2000 lux (Deux ampoules de 40 Watts sont suffisantes pour quatre récipients d'incubations)(Fig. 17).

La procédure standard employée est celle de (Sorgeloos et al. 1986) ; Elle consiste à incuber 250 mg de cystes dans un récipient cylindro-conique, contenant 100 ml de l'eau de mer naturelle filtrée (0.45 et 0.2µm). Les cystes doivent être maintenus en suspension en appliquant une aération par le fond du récipient (Fig. 17). La température est maintenue à 26°C, parfois à 28°C à l'aide d'un thermostat, les jeunes larves sont ainsi obtenues au bout de 24 heures et sont évidemment nourries avec de la levure de bière et de la poudre de lait (Wit et Pravit, 1972 ; Dobbler et al., 1980).

La collecte de ces jeunes individus se fait à l'aide d'une pipette en matière plastique pour l'étude du test de toxicité.



Figure 17: Eclosion des cystes.

4.1.2. Détection des souches fongiques actives

4.1.2.1. Préparation des plaques et incubation

Un premier test de dépistage qualitatif a permis de sélectionner les souches actives. Les tests sont réalisés dans des plaques de culture cellulaire de 24 puits (Fig. 18). Le volume de liquide contenu dans chacun des puits est de 2,5 ml. Les jus de fermentation des champignons sont testés directement, après filtration stérilisante sur papier Whatman n° 01, sans extraction préalable. Pour chaque échantillon et chaque dilution, 2 réplicats sont réalisés.

Chaque plaque contenait un témoin négatif représenté par de l'eau de mer stérile et un témoin d'innocuité du milieu liquide non ensemencé. En effet, le jus de culture de champignons étant testé directement, il était nécessaire de s'assurer que le milieu de culture n'était à l'origine d'aucune toxicité. Dans chaque puits sont ajoutées 10 larves obtenues précédemment. Le nombre précis de larves est noté pour chaque puits afin de déterminer ultérieurement la CL_{50} . Les plaques sont alors mises à incuber à l'obscurité pendant 24 h à température ambiante.

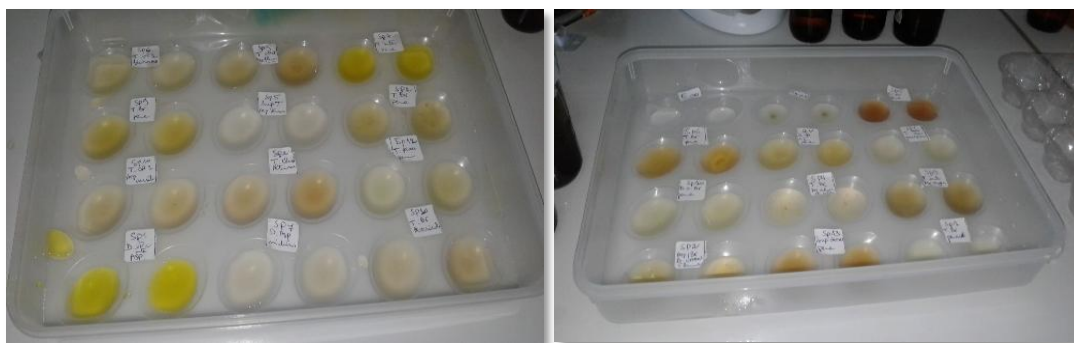


Figure 18 : Plaques de culture.

4.1.2.2. Lecture

Après ce délai de 24h, les larves mortes (immobiles pendant au moins 10 secondes) sont comptées.

5. Détermination de la CL₅₀ des soucheactives

5.1. Préparation des plaques

Les souches actives sélectionnées par le premier test de dépistage font ensuite l'objet d'une étude plus approfondie. Pour la détermination de leur CL₅₀, les jus ayant montré une forte activité lors du premier test sont dilués avec des différentes concentrations (20, 40, 60 et 80 µg/ml) dans de l'eau de mer stérile. Quatre réplicats de chaque dilution sont à nouveau testés.

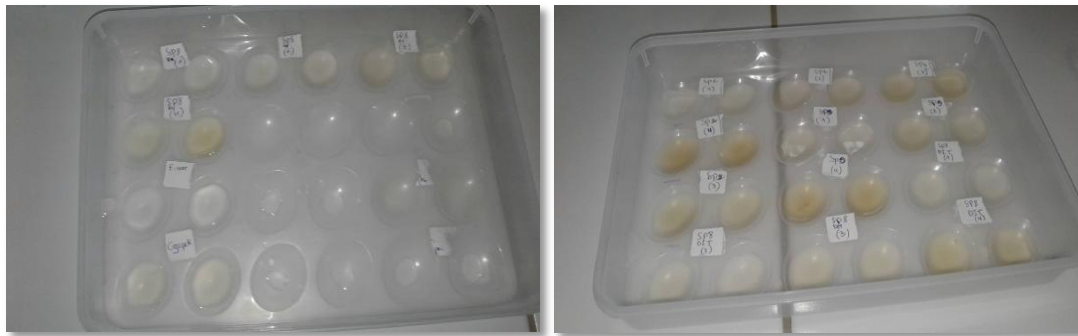


Figure 19: Test de létalité CL₅₀.

Après 24 heures, on compte le nombre des individus morts dans les boîtes tests et le témoin; Au delà, on peut définir la concentration létale médiane CL₅₀ de chaque filtrate selon les différentes concentrations déterminées. Dans le cas où le témoin contient des larves mortes, le pourcentage de mortalité est corrigé en utilisant la formule suivante:

$$\% M = (NLP - NLT) / 10 * 100$$

Avec:

M: pourcentage de mortalité

NLP: nombre de larves mortes en présence du produit à tester

NLT: nombre de larves mortes en présence du témoin.

6.2. Calcul des CL₅₀

A partir de la courbe représentant le pourcentage de mortalité en fonction du logarithme de la concentration, il est possible de déterminer la CL₅₀ en calculant au préalable la pente (a) et l'ordonnée à l'origine (b) de la portion droite centrale de cette courbe selon l'équation :

$$CL_{50} = 10^{(50-b)/a}$$

Résultats et discussion

Sélection et étude des souches actives

Nous avons testé sur larves d'*A. salina* les filtrats de culture de 25 souches fongiques isolées de deux espèces de poissons d'aquaculture "*Sparus aurata* , *Dicentrarchus labrax*". Sur ces 25 souches, 4 se sont montrées actives, mais à des degrés de toxicité différents. Les résultats globaux de ces tests sont regroupés en tableau 05 .

Tableau 05 : Résultats de l'activité de toxicité.

Genre	Référence	NNM (Nombre de Nauplius Morte)	TM%(taux de Mortalité)
<i>Penicillium</i>	<i>Pen lr sp 1</i>	05	30%
<i>Penicillium</i>	<i>Pen lr sp 2</i>	03	10%
<i>Penicillium</i>	<i>Pen lr sp 4</i>	03	10%
<i>Penicillium</i>	<i>Pen lr sp 5</i>	04	20%
<i>Penicillium</i>	<i>Pen lr sp 6</i>	03	10%
<i>Penicillium</i>	<i>Pen lr sp 7</i>	09	70%
<i>Penicillium</i>	<i>Pen lr sp 8</i>	09	70%
<i>Penicillium</i>	<i>Pen lr sp 9</i>	04	20%
<i>Penicillium</i>	<i>Pen lr sp 10</i>	04	20%
<i>Penicillium</i>	<i>Pen lr sp 11</i>	03	10%
<i>Penicillium</i>	<i>Pen lr sp 12</i>	03	10%
<i>Penicillium</i>	<i>Pen lr sp 13</i>	07	50%
<i>Aspergillus</i>	<i>Asp lr sp 1</i>	02	00%
<i>Aspergillus</i>	<i>Asp flv lr sp 2</i>	08	60%
<i>Aspergillus</i>	<i>Asp lr sp3</i>	04	20%
<i>Aspergillus</i>	<i>Asp lr sp 4</i>	05	30%
<i>Aspergillus</i>	<i>Asp lr sp 5</i>	04	20%
<i>Aspergillus</i>	<i>Asp flv lr sp 6</i>	03	10%
<i>Aspergillus</i>	<i>Asp Nid lr sp 7</i>	03	10%
<i>Aspergillus</i>	<i>Asp lr sp8</i>	04	20%
<i>Aspergillus</i>	<i>Asp N lr sp9</i>	10	80%
<i>Aspergillus</i>	<i>Asp ver lr sp10</i>	02	00%
<i>Alternaria</i>	<i>Alt lr sp1</i>	05	30%
<i>Alternaria</i>	<i>Alt lr sp 2</i>	04	20%
<i>Alternaria</i>	<i>Alt lr sp 3</i>	03	10%

De ce tableau , il ressort que le genre *Penicillium* est celui qui renferme la plus forte proportion de souches toxiques pour les larves d'*A. salina* puisque c'est sur ce test que les souches actives ont donné un résultat positif, cette proportion monte que les *Penicillium* représentent d'ailleurs près de 50% des souches toxiques (2 /4 souches toxiques sélectionnées)

Le genre *Aspergillus* a présenté également 50% des souches toxiques (2/4 souches toxiques sélectionnées). Si on considère seulement l'activité forte, les genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont très nettement les plus importants .

Le genre *Alternaria* par contre semble inactif , puisque aucune des trois souches testées ne s'est montrée toxique .

Ces résultats prouvent que les genres *Penicillium* et *Aspergillus* sont parmi les plus toxigènes en souches testées . Mais ce n'est pas le cas du genre *Alternaria* puisque il ne s'est pas montrée toxique sur ce test, pourtant le genre *Alternaria* est connu pour être très producteur de mycotoxines, qui sont détectables par le test sur *A. salina*.

Le test sur larves d'*A. salina*, qui permet d'éliminer les souches non actives et sélectionner principalement des espèces de genres connus pour être toxigènes, confirme donc ici son intérêt pour la recherche de souches marines productrices de toxines. De plus, le test que nous avons développé, par modification du protocole d'origine de Persoone, utilise directement le filtrat de culture du champignon et non pas un extrait de ce filtrat. Ceci présente l'inconvénient de tester des substances plus diluées que dans un extrait, mais a l'avantage de livrer au test l'ensemble des métabolites sécrétés par le champignon et pas uniquement ceux qui sont extractibles dans les conditions utilisées pour la préparation des extraits. Ceci représente donc un point fort pour un criblage d'activité .

Tableau 06 : Pourcentage de mortalité pour les différentes concentrations.

Les souches fongiques	Souche 01 (<i>Asp f lr sp2</i>)		Souche 02 (<i>pen lr sp7</i>)		Souche 03 (<i>Pen lr sp8</i>)		Souche 04 (<i>Asp n lr sp9</i>)	
	M%	Ln [c]	M%	Ln [c]	M%	Ln [c]	M%	Ln [c]
20	50%	2.99	40%	2.99	50%	2.99	60%	2.99
40	60%	3.68	40%	3.68	40%	3.68	50%	3.68
60	70%	4.09	60%	4.09	60%	4.09	70%	4.09
80	70%	4.38	70%	4.38	70%	4.38	80%	4.38

Le tableau n° 06 représente les différentes concentrations qui ont présenté jusqu'à 80 % de mortalité de *l'Artémia salina* après 24 heures par les différents extraits fongiques.

Les souches ont donné des taux de mortalité de 50 % à 70 % pour *Aspergillus flavus* sp2, 40 % à 70 % pour *Penicillium* sp7, le *Penicillium* sp8 à donner une mortalité de 50 % à 70 % et enfin *Aspergillus* sp9 a affiché un taux de mortalité allant de 50 % à 80 %.

Les souches ont donné des résultats différents pour chaque concentration soumise à la saumure et le pourcentage de mortalité des larves croît en fonction de la concentration ; ce qui est clairement illustré par les courbes représentées dans la figure N° 20.

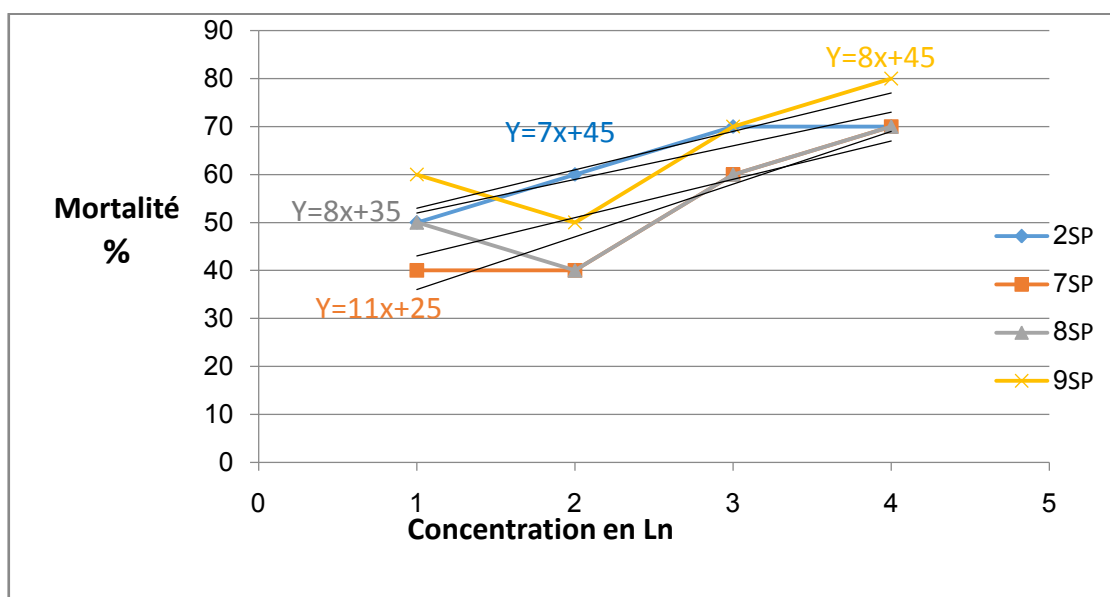


Figure 20: Courbe de taux de mortalité.

On peut relever de la figure 20 que le pourcentage de mortalité de *l'Artémia salina* augmente après 24 heures d'exposition aux différentes concentrations des extraits des souches toxiques, qui a été supérieur à 50% pour la plupart des souches dans le test de toxicité.

Ce résultat est néanmoins intéressant car une activité sur une souche peu sensible a plus de chances de refléter une réelle toxicité de la substance testée.

L'étude plus approfondie des souches préalablement sélectionnées (test de quatre concentrations de filtrat de culture) a permis de déterminer leurs CL₅₀ (exprimées en pourcentage de filtrat de jus de culture des champignons entraînant une mortalité de 50% des larves). Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 07.

Determination de CL₅₀

Tableau07: CL₅₀ calculées pour les souches sélectionnées classées potentiellement toxiques

Genre	Référence	CL ₅₀
<i>Penicillium</i>	<i>Pen lr sp 7</i>	186.21
<i>Penicillium</i>	<i>Pen lr sp 8</i>	74.98
<i>Aspergillus</i>	<i>Asp flr sp 2</i>	5.18
<i>Aspergillus</i>	<i>Asp n lr sp 9</i>	4.22

Les CL₅₀ moyennes obtenues sont entre 4.22 et 186.21 ug/ml. Les deux premières valeurs (4,22 et 5,18) sont plus faibles que celles déterminées par Persoone (1980) (13,5 et 19,9 ug /ml) et à celles trouvées par Sellenave (1999) (23,8 et 33,3 ug /ml), en utilisant un témoin positif de référence défini par Persoone (1980) pour la calibration du test de toxicité et qui est le laurylsulfate de sodium (ou dodecyl sulfate de sodium), par contre les deux dernières valeurs (74,98 et 186,21 ug /ml) sont beaucoup plus élevées que celles constatées par les mêmes auteurs. Ce résultat peut s'expliquer de deux façons. Tout d'abord, la souche utilisée pourrait être moins sensible que celle de référence. D'autre part, le protocole de Persoone a subi des modifications, en particulier en ce qui concerne les conditions d'éclosion et d'élevage (température, éclairage) des larves et le volume de liquide dans lequel le test est réalisé.

Les CL₅₀ ainsi obtenues permettent de distinguer trois grands groupes dont les limites correspondent aux discontinuités des résultats : fortement actifs CL₅₀<30% le cas de *Asp lr f sp2* (5.18) et *Asp n lr sp9* (4.22), moyennement actifs CL₅₀<90% le cas de *Pen lr sp7* (186.21) et faiblement actifs CL₅₀>90% le cas de *Pen lr sp 8* (74.98). Les inactifs ayant été éliminés précédemment.

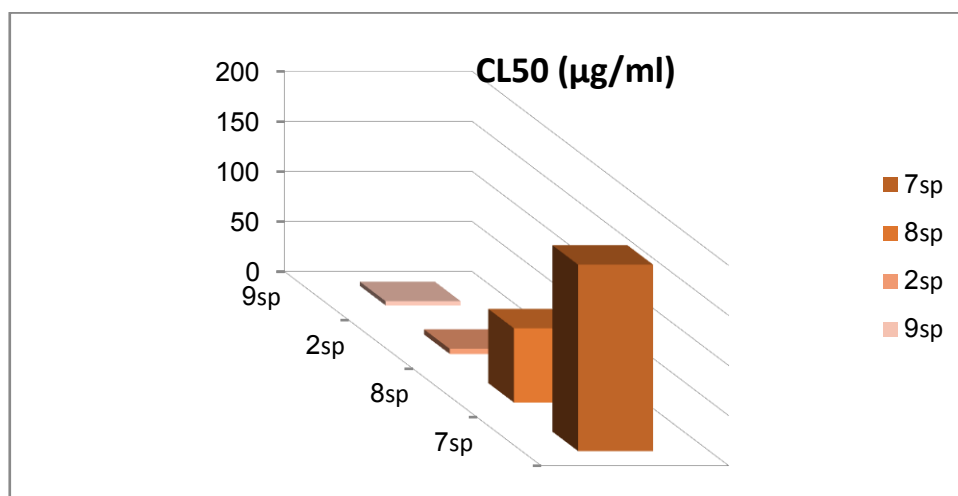


Figure 21 : Valeurs des concentrations létales «CL₅₀».

Hisotgramme (Figure 21) montre et confirme la détermination de CL_{50} , et que les souches de (*Asp lr f sp2*) (5.18 ug /ml) et (*Asp n lr sp9*)(4,22 ug /ml) sont hautement toxiques à l'égard des larves d'*Artémia salina*.

Les résultats de sélection des souches actives par le test de toxicité, montrent qu'il ya 04 souches toxigènes en dehors des 25 souches étudiées, les expériences réalisés ont révélé que les genres les plus toxigènes sont les *Aspergillus* et les *Penicillium*. Nos résultats concordent parfaitement avec ceux trouvés par Sellenave (1999) et ceux de Matallah- Boutiba (2009) en travaillant sur la toxicité des souches fongiques isolés des coquillages au niveau du littoral ouest algérien.

Les tests de toxicité sont effectués pour évaluer la sécurité ou les dangers présentés par des substances telles que les produits de consommation, les produits pharmaceutiques, les produits naturels et les produits chimiques industriels. Un grand nombre de méthodes actuelles d'essai de toxicité incluent, l'utilisation d'animaux de laboratoire tels que souris, rats ou lapins. Toutefois, dans cette étude, des espèces d'organismes d'essai plus fiables ont été utilisées : *l'Artemia salina*, communément appelée crevette à saumure.

Cette étude a été réalisée pour tester le potentiel de toxicité des métabolites secondaires de 25 souches fongiques isolées de deux espèces de poissons d'élevage : la daurade royale "*Sparus aurata*" et le loup de mer "*Dicentrarchus labrax*" et cela à l'aide du test de létalité des crevettes. Il s'agit d'un dosage qui déterminera le potentiel de toxicité d'une substance à l'aide du taux de mortalité des nauplii de crevette saumure et identifiera la concentration létale médiane (CL₅₀) à l'aide d'une analyse par différentes expressions linéaires. Dix (10) nauplii de crevette saumure ont été exposés aux différentes concentrations (20, 40, 60 et 80 µg/ml) des différents filtrats de cultures fongiques. Le taux de mortalité des crevettes de saumure exposées à chaque filtrat a été déterminé et enregistré sur une période de 24 heures.

Selon les résultats obtenus, quatre souches fongiques parmi 25 souches, se sont montrées toxiques vis-à-vis les larves de *l'Artemia salina*. Il s'agit de deux souches appartenant au genre *Penicillium* (*Pen lr sp7*) et (*Pen lr sp 8*) et deux autres souches appartenant au genre *Aspergillus* (*Asp n lr sp 9*) et (*Asp flr sp2*), ce qui représente 50 % pour chaque genre.

L'étude des souches isolées et leur sélection par le test de toxicité sur les larves *d'Artemia salina* a permis de montrer que certaines moisissures sont potentiellement toxigènes et peuvent présenter un danger sur la santé publique ainsi que de nombreuses pertes économiques (Hassan et al., 2007 et El Ahl, 2010). La qualité des produits utilisés dans les aliments pour poissons d'élevage est devenue un facteur limitant de l'activité, car ces aliments sont des substrats idéaux pour la croissance des champignons qui, dans des conditions favorables, peuvent favoriser la synthèse de mycotoxines. Ces métabolites secondaires sont doués de potentialités toxiques à l'égard de l'homme et des animaux.

Les résultats ont montré que les genres les plus actifs sur le test de toxicité sont : *Aspergillus* et *Penicillium* qui sont aussi les plus toxigènes en milieu terrestre, par contre *Alternaria* est très toxigène en milieu terrestre par contre en milieu marin, leur souche testée est inactive.

La sélection préalable de souches actives a aidé énormément à la détermination de la CL_{50} . Les valeurs moyennes des CL_{50} , calculées en fonction de l'intensité de l'effet toxique sur *Artemia salina*, s'étalent entre 4.22 et 186.21 $\mu\text{g/ml}$. (*Asp f lr sp2*) et (*Asp n lr sp 9*) se sont montrées hautement toxiques avec des valeurs de CL_{50} comprises entre 5,18 $\mu\text{g/ml}$ et 4,22 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. En ce qui concerne les *Penicillium*, *Pen lr sp7* est moyennement actifs, alors que *Pen lr sp 8* est faiblement actif, les valeurs de leurs CL_{50} sont de 186.21 $\mu\text{g/ml}$ et 74.98 $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

En perspective, notre travail nécessite d'autres études complémentaires telles que:

- ♣ Compléter les identifications des champignons au niveau des espèces.
- ♣ étendre l'étude sur un grand nombre d'espèces fongique et d'organismes marins.
- ♣ étudier d'une manière approfondie l'écologie des champignons toxigènes.
- ♣ Extraction et caractérisation des mycotoxines actifs par des méthodes plus spécifiques.
- ♣ Rechercher des champignons qui peuvent se nourrir de mycotoxines.

-A-

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

Agag B.I. 2004. Mycotoxins in foods and feeds 3-Zearalenone. Ass. Uni. Bull. Environ. Res. (7):2.

Ait Abdelouahab N. 2001. Microbiologie alimentaire. Office des publications

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

-B-

Barigozzi. 1974. Genus *Artemia*: Problems of systematics. In: G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers 5eds. The brine Shrimp *Artemia*. Vol. 1.

Baudouy A.M., Tuffery G. 1973. Connaissances actuelles sur un syndrome mycosique affectant les populations piscicoles des rivières à salmonides de la France. Bulletin français de pisciculture. Quarante-cinquième année, N° 249

Bennett J.W. 1987. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and Mycopathologia. Mycopathologia, 100, 3-5.

Blackwell M., R. Vilgalys et J.W. Taylor. 1998. Fungi, Eumycota. In The Tree of Life, D.R. Maddison et W.P. Maddison editor, University of Arizona.
<http://tolweb.org/tree?group=Fungi&contgroup=Eukaryotes>

Blaise C. 1998. Microbiotesting: an expanding field in aquatic toxicology. Ecotoxicology and Environmental Safety, 40: 115-119..

Boiron P. 1996. Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan. P : 13-19-69-79.

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

Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpen J.P., Reymond P., Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J. 1989. Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. P : 216-244.

Bowen S.T. 1963.Genetics of *Artemiasalina*. III. Effects of X-irradiation and of freezing upon cysts. Biol. Bull., 125 (3): 431-440.

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

-C-

Carlile M.J., Watkinson S.C. 1994. The Fungi. (Academic Press eds).

Caruso D TalamondP Moreau Y. 2013. Mycotoxines et pisciculture : un risqueoublié ? CahAgric22 : 165-73

Clegg J.S., F.P. Conte.1980. - A Review Ot The Cellular And Developmental Biology Of Artemia. In : The Brine Shrimp Arternia. Vol. 2, Physiology, Siochemistry, Molecular Biology, EdsPersoone G. ; P. Sorgeloos ; O.A. Roels ; E. Jaspers ;Universa Press, Wetteren (Belgium), 11-54.

Curtos E. D. 2006. Life at low water activity.Philos Trans R SocLond B BiolSci359: 1249–1267.

-D-

Dahloum L. 2007.Contribution à l'étude de trois populations d'artemia endémiques aux eaux des salinesdeBethiou, de Sidi Bouziane et le lac salé d'El Meniâ. Mémoire de Magister en Sciences Agronomiques, Université Abd El Hamid Ibn Badis -Mostaganem. Algérie.

Davet P.1996.Vie microbienne et production végétale.INRA Editions (Paris) p 383

Davidson B.S. 1995. New dimensions in natural products research : cultured marine microorganisms. Curr.Opin.Biotechnol., 6, 284-291

Defaye D., Rabet N. & Thiery A. 1998. Atlas Et Bibliographie Des Crustacés Branchiopodes (Anostraca, Notostraca, Spinicaudata) De France Métropolitaine. Muséum National D'histoire Naturelle, Paris, 61 P

Dhont G. Van Stappen. 2003. Biology, tank production and nutritional value of *Artemia* Live. Feeds in Marine Aquaculture, Blackwell Science Ltd., pp. 65-121

Dobbeileir J., Adam N., Bossuyt E., Bruggman E., Sorgeloos P. 1980 : New aspects of the use of inert diets for high culturing of brine shrimp: 165-174. In: The brine shrimp *Artemia*. Vol 3. Ecology, culturing use in aquaculture. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.) Universa Press Wetteren, Belgium, 456pp.

Dufresne P., & St-Germain G. 2013- Identification des champignons d'importance médicale : Stage de laboratoire, Laboratoire de Santé Publique du Québec, 57 p.

-E-

Ehrlich GD., Hu FZ., Shen K., Stoodley P., Post JC .2005 . Bacterial plurality as a general mechanism driving persistence in chronic infections. ClinOrthop.;437.

El-Ahl M.H.S. Rasha. 2010. Studies on fungi in fish and fish products and their control. Ph. D. Thesis, Dept. of Microb, Fac. of Vet. Med., CairoUniv.

-F-

Flossner. 1972. A new classification of the branchiopod Crustacea. Zoologic Journal of the Linnean society, 91, 357-383.

Frazier W.C. 1967. Food microbiology. Academic presse. London. P : 3-429.

Frisvad J.C., Samson RA. 1989. Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage and mycotoxin production. Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser., 18, 1-149.

-G-

Geacintov Nicholas E and Broyde S. 2011. The chemical biology of DNA damage. Wiley-VCH;p: 4

Gilbert B. 1991. Laboratoire d'ecologie Marine station de biologie Marine Quai de la Daurade Professeur, université de montpellier, 34200 SETE.14110 condé-sur-noireau (France).

Giraud J. 1998. Microbiologie alimentaire. Edition Donod, Paris. P : 8-101.P : 330

Granvillettrece. 2000. *Artémia* Production for Marine Larval Fish Culture. Southern Aquaculture Regional Center. SRAC Publication No. 702.

Gunther. 1900. Contribution to the natural history of Lake Urmi, N.W. Persia and its neighborhood. Transcript of Linnean Society London, 27,345-453.

-H-

Haddage. 1991. Contribution à l'étude d'une souche d'*Artémia (Artémia tunisiana)* endémique aux eaux de la saline d'Arzew, Algérie. Thèse Magister. Ins. Sciences de la mer et de l'aménagement du littoral, ALGER.

Hassan A.A., Hammad A.M., El Barawy A.M and Manal A.H. 2007: Incidence of aflatoxigenic fungi in frozen and canned fishes and trials to inhibit aflatoxin production by use of some minor elements and *lupinus termis* seeds. Egypt. J. Appl. Sciences, 22 (10B) 351-360.

Henstschel E. 1968. Die podt Embryonal En Entwicklung Satadienvou Artemia Sauna Leach Beiverchieden En Temperatureo (Anostraca, Crustacea). Zoll. Ànz , 180.372-384.

Hfath. 1924. Sur la présence d'*Artemia* dans les anciens ports de Carthage. Extrait du bulletin de la société d'histoire naturelle de l'Afrique du nord. In: Turki, S. 1986. Etude des œufs d'*Artemia salina* (Leach 1819) dans les salines de Megrine- Tunisie. Bull. Inst. Scient. Techn. Océanogr. Pêche Salammbô. 13 : 25-32.
industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. p : 34-428.

-J-

James T.Y., Porter D., Leander C.A., Vilgalys R., Longcore J.E. 2000. Molecular phylogenetics of the Chytridiomycota supports the utility of ultrastructural data in chytrid systematics. *Canadian Journal of Botany*. 78: 336-350.

Janat et al., 1986: International study on *Artémia*.XVI. Survival, growth and reproductive potential of the mysid *Mysidopsis bahia* fed various geographical strains of the brine shrimp *Artémia* . J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 53(2-3): 209-219.

Jennings D.H., Lysek G. 1996.Fungal biology: understanding the fungal lifestyle. (Bios Scientific publishers eds).

Joly. 1840. Histoire d'un petit crustacé (*Artémiasalina*) auquel on a faussement attribué la coloration rouge des marais-salants méditerranéen. Ann. Sci. Nat. 2 13, pp. 225- 290. In : Ben Abdelkader, N. 1985. L'*Artémia* dans les chotts, les sebkhas et les salines de Tunisie. Bull. Inst. Natn. Scient. Tech. Océanogr. Pêche Salambo. 12 : 87- 95.

-*K*-

Kara M.H., Bengraïne K.A., Derbal F., Chaoui L. and Amarouayache M. 2004. Quality evaluation of a new strain of *Artemia* from Chott Merouane. Aquaculture, 235: 361-369

Kellog . 1906. A new *Artemia* its life condition. Sciences, 24,594-596.

Kendrick B. 1999.The fifth kingdom. 2nd edition. Mycology Publications.

<http://www.mycolog.com/fifthtoc.html>.

Klich M., Mendoza C., Mullaney E., Keller N and Bennett, J. W. 2001. A New

Kohlmeyer J. et Kohlmeyer E. 1979. Marine mycology: the higher fungi; Academie press, New York; 690 pages.

Krska R. 2009. Mycotoxins. Anal Bioanal Chem. 395: 1203–1204.

-*L*-

Labbé Ronald G., García S. 2001. Guide to food borne pathogens. Wiley; p : 400 .

Lavenset Sorgeloos. 2000. The history present status and prospect of the availability of *Artemia* cysts for Aquaculture, 181,397-403.

Le bars J. et Le bars P. 1988. Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. Bull. Ass. A. E. Edition. Pasteur Paris, 30, (115), 8-21.

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

Leveau S. B., Bouix M. 1993. Les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. P : 216-244.

Liberra K. et Lindequist U. 1995. Marine Fungi - a prolific resource of biologically active natural products? Pharmazie, 50 (9), 583-588.

Linnaeus. 1758. Weaning of wild young-of-the-year winter flounder *Pleuronectesamericanus* (Walbaum) on a dry diet: effect on growth, survival and feed efficiency ratios. *J. World Aquacult, Soc* 27, 30-39.

-M-

Madani. 2001. Ministère de la pêche et des ressources Halieutiques pour la pêche et l'aquaculture, Manuel pratiquesur l'*Artémia*, CNDPA.

Madelin T.M. 1994. Fungal aerosols: a review. *Journal of aerosol science.* 25: 1405- 1412 microbes.

Mioara Dumitrascu 2011: Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Environ Microbiol* 2: 243-250.

Mueller G.M., Schmit J.P. 2007. Fungal biodiversity: what do we know ? What can we predict? *Biodiversity and Conservation.* 16: 1-5.

-O-

OMS. 1980. Mycotoxines. Critères d'hygiène de l'environnement 11. Publications. De l'OMS Genève, p: 142.

-P-

Pamel E. V., Vlaemyck G., Heyndrickx M., Herman L., Verbeke A., Daeseleire E. 2010. 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. *Mycotox Res.* 1-11.

Placinta C.M., D'Mello J.P.F and Macdonald A.M.C. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal feed science and Technology.* p: 21-37.

Punt P. J., Van Biezen N., Conesa A., Albers A., Mangnus J. & Van den Hondel C.

-R-

Rabie C.J., M. Steyn & G.C. van Schalkwyk. 1977. New species of *Aspergillus* producing sterigmatocystin. *Appl. Environm. Microbiol.* 33: 1023–1025.

Raven P.H., Evert Ray F., et Eichhorn Susan E. 2000. *Biologie végétale*, Edition : Paris P :968.

Reboux G. 2006. Mycotoxines : effet sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*. 46 : 208–212.

Redecker D. 2002. New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil, *Research in Microbiology* 153:125-130

Roberts R.J. 1979. Pathologie du poisson. Maloine S.A. éditeur, Paris ISBN 2.224-00538-5, p:317

Rojas M.R., Hagen C., Lucas W.J., Gibertson R.L., 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology* 43: 361-394.

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

-S-

Sallenave-Namont C. 1999. Etude de la flore fongique des zones conchylicoles de l'estuaire de la Loire, recherche de souches toxigènes, Thèse en Pharmacie, Université de Nantes, France, 194 p

Sanglier J.J., Vayssier Y and Veau P. 1990. Moisissures utiles et nuisibles importance

Santacroce MP., Conversano MC., Casalino E., Lai O., Zizzadoro C., Centoducati G., et al. 2008. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 18 : 99-130.

Schehardt A. 1987 Scanning Electron Microscope Study Of The Post-Embryonic Development Of Artemia .In : *Artemia Research And Its Applications*, Vol.1. (Ed By P, Sorgellos., D.A, Bengston., W, Declair Et E, Jaspers), Pp.5-32. Universa Press, Wetteren

Seo S.Y., Sharma V.K., Sharma N., et al. 2003 Mushroom tyrosinase: Recent prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2837-2853. doi:10.1021/jf020826f

Smith John E., Moss M.O. 1985. Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance. Wiley; p: 148 P.

Sorgeloos Coutteau. 1994. Correct taxonomic identification of *Artemia* species. *Aquacult. Research*, 26:147.

Sorgeloos. 1979. The brine shrimp, *Artemia salina*: A bottleneck in Mariculture: 321- 324. In: *FAO Technical Conference on Aquaculture*, Koyoto 1976. Pillay, T.V.R. Dill, Wm. A. (Eds). Fishing News Books Ltd., Farnham, England, 653 pp.

Sparrow Jr. 1934. Observations on Marine Phycomycetes collected in Denmark. Dansk Botanisk Arkiv., 8 (6).1-23.

sterigmatocystin-producing *Emericella* Variant from Agricultural Desert Soils. *System. Appl.*

Strullu D.G. 1991. Les mycorhizes des arbres et des plantes cultivées .Edition : Tec et Doc. Lavoisier, Paris .P :248 .

-T-

Tabuc C. 2007. Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de Doctorat d'université: Pathologie, Mycologie, Génétique Et Nutrition. Toulouse : L'institut National Poly Technique Et De L'université De Bucarest. France. 190p.

Tortora J., Funk B.F. and Case Ch.I. 2003. Introduction à la microbiologie, (edn) Universitaires, 52 pages.

Tuomi T., Johnsson T., Hintikka E.L and Reijula K. 2001. Detection of aflatoxins

-U-

Ueno Y. 1977. Trichothecenes: overview address. In J. V. Rodricks, C. W. Hesseltine, and M. A. Mehlman (ed.), *Mycotoxins in human and animal health*. Chem-Orbital, Park. Forest South, Ill. p: 189-207.

-V-

Van Steppen. 1996. Determination and identification of biological characteristics of *Artemia urmiana* for application in aquaculture. In: *Artemia Lake Cooperation Project contract*. Laboratory of Aquaculture and *Artemia* Reference Center, Gent University, Belgium, pp. 106.

Verbist J.F., Sallenave C. et Pouchus Y.F. 1998. Marine fungal substances. In « *Studies in Natural Product Chemistry* ». Elsevier Science Publishers. Amsterdam. (Sous presse).

-W-

Webber H.H.; Sorgeloos, P.-1980. Report Workshop II. Commercial Aspects Of *Artemia* Exploitation: 413. In: *The Brine Shrimp Artemia*. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use

In Aquaculture. Persoone, G.; Sorgeloos, P; Roels, O.; Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, 456 Pp.

-X-

XuXiangming., Bailey J.A and Cooke B.M. 2003.Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi. Springer; p: 129.

Site web

www.aspergillus.man.ac.uk

Annexes

Composition des milieux de culture

Milieu Sabouraud- Chloramphénicol

Peptone	10 g
Glucose massé	35 g
Agar-Agar	15g
Eau distillée	1000 ml
Chloramphénicol	0,5 %
PH	6

Milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Pomme de terre (macération 500ml de filtrat)	200 g
Dextrose	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7

Milieu CzapekDox + Extrait de levure(CYA)

Sucrose	30 g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCL	0.5 g
MgSO ₄	0.5 g
FeSO ₄	0.01 g
NaNO ₃	3 g
Extrait de levure	2,5 g
Eau de mer	1000 ml
pH	6

Annexes

Tableau 01 : Nombre de nauplius morts et vivants dans les milieux témoins

Milieux témoins	Nauplius vivants	Nauplius Morts
Eau de mer	7	3
CYA (Dox)	5	5