



Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE



RAPPORT TECHNIQUE

MAHERIZO Tiandrainy G. F.

SOMMAIRE

I- INTRODUCTION

II- MATERIELS ET METHODES :

A- SITES D'ETUDES

Localisation :

B- METHODES

1- ECHANTILLONNAGE :

Sites de collecte des échantillons :

2- IDENTIFICATION MOLECULAIRE DE SOUCHES

a- Isolement des souches et culture:

b- Extraction d'ADN et PCR (Polymerase Chain Reaction) :

PCR :

L'amplification de l'ADN :

Séquençage :

c- Identification :

3- IDENTIFICATION DE METABOLITE SECONDAIRE :

a- Culture et extraction :

Culture :

Extraction :

b- Purifications :

La déréplication et analyse en spectrométrie de masse :

La chromatographie sur couche mince (ccm) analytique :

Chromatographie flash sur gel de silice de l'extrait brut de *Byssochlamys l.* et

d'*Aspergillus niger* :

III- RESULTATS :

A- Résultat d'échantillonnage :

B- Identification moléculaire des champignons

C- Identification moléculaire des métabolites secondaires

- Analyse en spectrométrie de masse et déréplication
- Chromatographie sur couche mince
- Chromatographie sur couche mince de la purification de l'extrait brut de *Byssochlamys l.*
- Test d'activité des fractions :
- chromatographie flash de la fraction G10BI-1-1
- Chromatographie sur couche mince des 74 tubes :
- Résultat de la Chromatographie sur couche mince des fractions pures
- Le résultat de l'HPLS-LCM

IV- DISCUSSION :

A- Collecte d'échantillon :

B- Identification moléculaire des souches de microfunges

C- Identification moléculaire des métabolites secondaires :

V- CONCLUSION ET PERSPECTIVES :

REMERCIEMENTS :

I- INTRODUCTION

Ces dernières décennies le problème des pathologies des crustacés et surtout ceux des crevettes touche beaucoup de pays œuvrant dans le domaine de l'aquaculture. Depuis 2007, ce problème touche Madagascar en particulier dans la partie de la côte Sud Ouest et Ouest. Et vers le mois de septembre 2012 une des plus grosse entreprise d'exportation de crevette AQUAMEN a dû fermer complètement sa porte à cause d'une pathologie nommée "WSSV "(white spot syndrome virus) non dominée au sein de la ferme dont l'ouverture prochaine est encore incertaine. La question qui se pose c'était de savoir si ce sont seulement les virus qui sont responsables de la perte au niveau du cheptel ou est ce que les champignons ont un rôle dans cette pathologie ?

L'objectif principal de cette thèse est d'étudier la biologie des champignons microscopiques associés aux crustacés pour comprendre le type d'association qu'ils réalisent avec leurs hôtes (parasitisme, saprophytisme, symbiotisme), en se focalisant sur le cas particulier des crevettes.

Mais dans le cadre de ce financement le but précis était de réaliser une identification moléculaire des champignons isolée des crevettes.

Les champignons microscopiques sont parmi les microorganismes infectant beaucoup les crustacés depuis quelques années (LIMA et all. 2011, PHAM et all. 2009, RAMAIIH 2006). Ils sont responsables de la perte de crustacés et particulièrement des crevettes dans les fermes aquacoles et en milieu naturel. Des microsporidies seraient également impliquées dans les pathologies des crevettes (Highlands, N. J. 1974, p.45), mais ces organismes sont des parasites obligatoires qu'il est impossible d'obtenir en culture.

L'identification morphologique des champignons microscopiques au niveau de l'espèce est difficile à cause du manque de caractères phénotypiques et maintenant l'identification moléculaire est appliquée de façon routinière en mycologie. C'est donc cette méthode performante et fiable que nous avons utilisée pendant le stage pour aboutir à l'identification des espèces des champignons microscopiques des crustacés.

Etant donné que le but de la thèse est de faire une étude sur les microfunges associés aux crustacés, il est aussi nécessaire de comprendre leur mécanisme de fonctionnement en se focalisant sur leur mycotoxine et leur métabolite secondaire.

II- MATERIELS ET METHODES :

A- SITES D'ETUDES

1- Localisation :

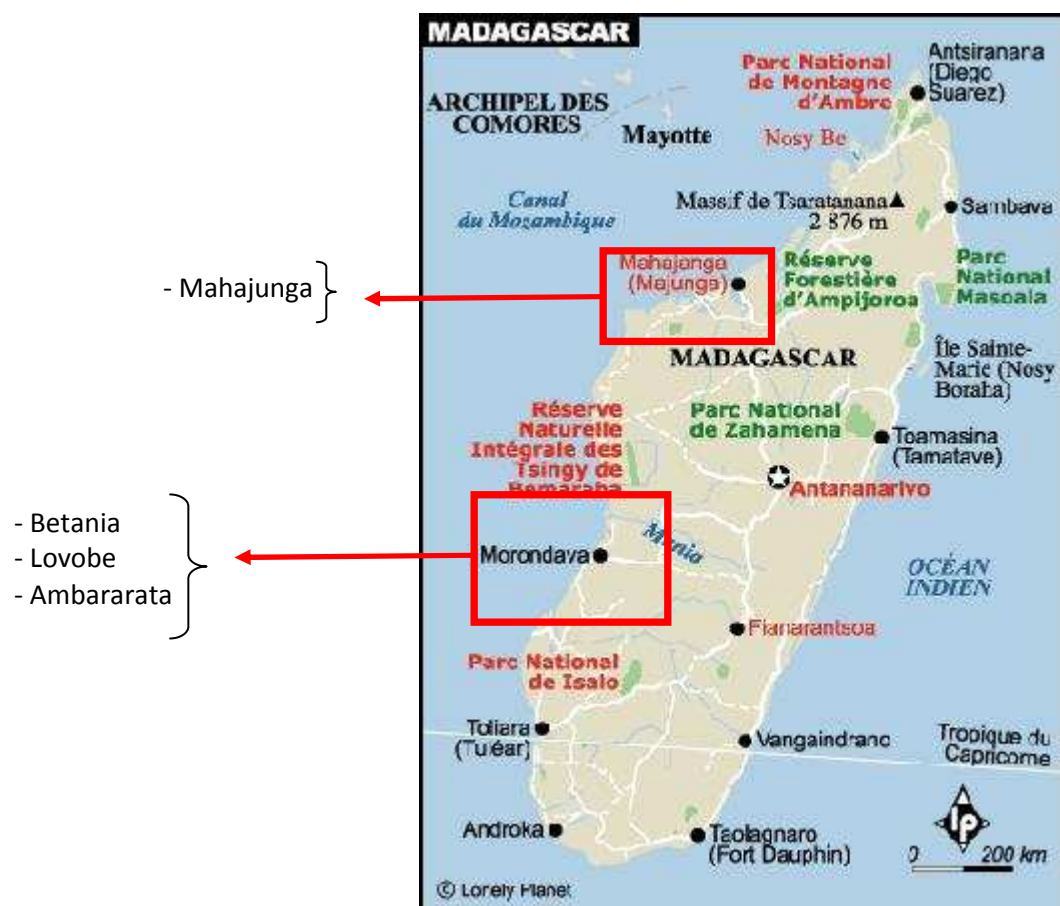


Figure 1 : Localisation des sites d'études (source FTM, Google)

Durant l'étude, nous avons utilisé une méthode simple. Nous avons collectés nos échantillons auprès des pêcheurs œuvrant dans le domaine.

Pour Majunga la collecte s'est fait au niveau des pêcheurs et des vendeuses. Mais par contre pour Morondava nous sommes allés collecter nos échantillons auprès des pêcheurs de Betania et à Ambararata.

Ambararata avec une localisation géographique, $20^{\circ}38'02.44''S$ et $44^{\circ}04'32.37''E$

Betania-Lovobe : $20^{\circ}18'57.50''S$ et $44^{\circ}15'32.76''E$

B- METHODES

1- ECHANTILLONNAGE :

➤ Sites de collecte des échantillons :

Collectes effectuées au niveau des pêcheurs même pour être sûr d'avoir du produit frais.

Avec 03 kg de crevettes sauvages et 02 tas en moyenne 300g de chaque sur le marché.

Deux sites de collecte ont été choisis sur la base de l'apparence des symptômes visibles sur les crevettes :

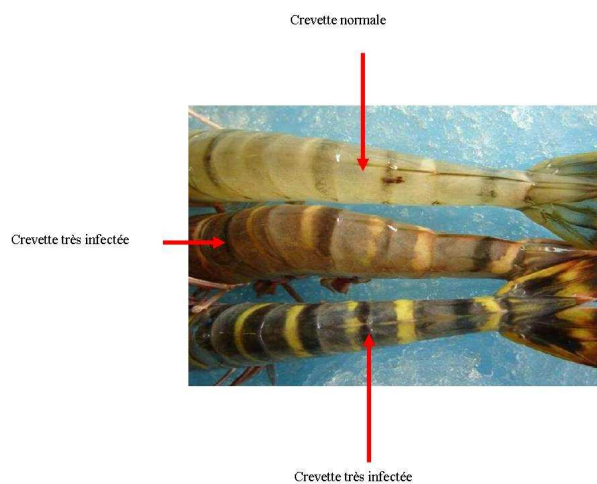
- présence d'une sorte de "coton" ou d'une sorte de lait (milk) sous la carapace le long de la face ventrale et dorsale, les branchies noires. Mais pour l'échantillon de 2014 nous avons remarqué aussi la présence de la tâche blanche au niveau de carapace de la tête « syndrome de WSSV (white spot syndrome virus) » pour le site de Majunga.
- Pour le site de Morondava, deux caractères ont attiré notre attention : l'apparition de la tâche blanche au niveau de carapace de la tête « syndrome de WSSV (white spot syndrome virus) » et le fait que les crevettes ont des grosses têtes très remarquables par rapport à la normale avec des branchies noires et des queues noires.



a



b



c

a : crevette avec white spot, b : crevette avec branchie noir, c : crevette avec coton

2- IDENTIFICATION MOLECULAIRE DE SOUCHES

d- Isolement des souches et culture:

Les tissus infectés ou les parties du corps de crevettes infectées (branchie, carapace, chair et même le signe d'anomalie présentant l'aspect « coton ou milk »), ont été déposés sur un milieu sélectif anti-bactérien, en particulier le milieu Malt Agar (MA : extrait de Malt 30g, agar 15g et eau stérile 1L) additionné d'un mélange de deux antibiotiques, oxytétracycline et streptomycine, à la concentration de 400mg/L pour l'isolement des champignons.

Dès que les colonies se développent, elles sont repiquées sur MA et incubées à 25°C dans le milieu de culture anti-bactérien jusqu'à ce que les mycéliums ou les spores soient prêts pour être repiqués sur du MA seul ou MA chloramphénicol.

Pour s'assurer de la pureté des souches, des isolements monospores ont été réalisés en utilisant une méthode de dilution garantissant la présence de colonies pures isolées.

Pour les souches (des bactéries) qui ont du mal à pousser sur du MA, nous avons essayé d'utiliser le YPD [YPD : Peptone 1g, yeast extract (oxoid) 1g, Glucose (Merck) 10g, sea salt 36g, agar (bacto) 14g et eau stérile 1L]

e- Extraction d'ADN et PCR (Polymerase Chaine Reaction) :

L'ADN génomique a été extrait à partir du mycélium frais ou des cellules de levures récupérés en surface de cultures de 5-10 jours sur MA. Le Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Ltd Crawley, Royaume-Uni) a été utilisé pour l'extraction. L'ADN extrait est conservé à - 20°C jusqu'à ce qu'on procède à l'amplification. L'ADN de tissu de crevette présentant une lésion blanche a été extrait directement à l'aide du même kit et testé à l'aide des amorces spécifiques des microsporidies.

PCR :

L'amplification de l'ADN :

Les amorces utilisées dans cette étude étaient les suivantes :

- LROR/LR6 (Vilgalys et Hester, 1990) ; LROR : 5'-ACC-CGC-TGA-ACT-TAA-GC-3' et LR6 : 5'-CGC-CAG-TTC-TGC-TTA-CC-3', pour amplifier un fragment de gène codant pour la petite sous-unité ribosomale 28s
- ITS4 /ITS5 (White et al., 1990) ; ITS4 : 5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3' et ITS5: 5''-GGA-AGT-AAA-AGT-CGT-AAC-AAG-G-3', pour amplifier les espaceurs internes transcrits de l'ARN ribosomique (ITS ARNr) et le 5.8S.

- Bt2a/Bt2b (Glass et Donaldson, 1995) ; Bt2a : 5'-GGT-AAC-CAA-ATC-GGT-GCT-GCT-TTC-3' et Bt2b : (5'-ACC-CTC-AGT-GTA-GTG-ACC-CTT-GGC-3') pour amplifier une partie de l'extrémité 5' de la β -tubuline (TUB)
- V1/PMP2 (Fedorko et al 1995) ; V1 : 50-CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC-30 et PMP2 : 50-CCTCTCCGGAACCAAACCCTG-30, amplifie un fragment du gène codant pour la petite sous-unité ribosomale 16S des microsporidies.

ITS4/ITS5, LROR/LRO6 et Bt2a/Bt2b: amorces pour les moisissures et levures

V1/PMP2 : pour la microsporidie (classée parmi les champignons récemment)

- Condition d'amplification :

L'amplification a été réalisée dans un volume final de 50 μ l, en utilisant 25 μ l d'extrait d'ADN (à la dilution 10^{-2}), 0.125 μ L Taq DNA Polymerase (Q-Biogen, 5 units/ μ L), 5 μ l de tampon (charge directe additionné de MgCl₂, QBiogen) , 2 μ l de dNTPs (250 μ M, dNTP Mix, Q-Biogen), 2 μ l de chaque amorce 10 μ M et 50-100 ng d'ADN matrice.

Le volume de chaque composant du Mix dépend du nombre de tubes à amplifier.

Procédure d'amplification :

Les amplifications ont été effectuées sur un appareil Pelher BioRad ADN Thermocycleur avec 30 cycles de 30 s à 94 °C, 30 s à 55 °C pour les couples d'amorces ITS4/ITS5 et Bt2a/Bt2b ou 50 °C pour les amorces LROR/LR6 et 40 s à 72 °C. Tous les programmes PCR se terminent par une étape d'extension finale de 5 min à 72 °C.

Les produits d'amplification ont été révélés par une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (Seakem GTG agarose, FMC BioProducts, Rockland, Maine) dans le tampon Tris-Borate-EDTA 1 X. 2,3 μ l de chaque produit d'amplification ont été déposés dans les puits, en référence à un marqueur de poids moléculaire (50 pb, Pharmacia Biotech) afin de vérifier la taille des fragments amplifiés. Du Sybr safe incorporé dans le gel permettait la visualisation des bandes d'ADN amplifié, sous rayonnement ultraviolet.

Séquençage :

Les produits de PCR ont été purifiés et séquencés par GENOSCREEN (Lille, France).

f- Identification :

Les séquences sont vérifiées par observation visuelle des chromatogrammes et éditées à l'aide du logiciel CodonCode (CodonCode Corporation, Dedham, USA). Les séquences sont comparées à

celles des séquences fongiques existant dans la base de données GenBank, par utilisation de l'option BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Les séquences de GenBank montrant la meilleure homologie sont examinées avec attention (séquences d'intérêt taxonomique provenant de souches référencées dans des collections publiques) avant d'assigner notre séquence à une espèce.

Puisque notre laboratoire d'accueil a des expertises bien déterminées et d'après les résultats obtenues, nous avons décidé de diriger notre étude sur deux souches *Aspergillus niger* et le *Byssochlamys laguncularia*.

3- IDENTIFICATION DE METABOLITE SECONDAIRE :

a- Culture et extraction :

➤ **Culture** : pour pouvoir faire des séries de purifications, il faut avoir une biomasse suffisante d'extrait brut des deux microfunges. Pour se faire nous avons fait une culture des deux espèces (*Aspergillus niger* et *Byssochlamys lagunculariae*) sur 07 milieux différents (CYA, DCA, KMS, MEA, PDA, YES, SES).

Pour l'étude des activités, les souches ont toutes été cultivées sur milieux solides : six milieux classiques et un nouveau milieu développé pour cette étude. Dans tous les cas il s'agit de milieux à base d'agar dissout dans de l'eau de mer reconstituée afin d'obtenir une salinité proche de celle observée en milieu marin.

Afin d'étudier plus particulièrement l'influence des métabolites sur les activités des extraits des souches isolées des crevettes, un nouveau milieu a été créé, par remplacement de l'extrait de levure du milieu YES par un extrait de chair de crevette. Par analogie avec le milieu YES, ce milieu a été ainsi nommé Shrimp Extract Sucrose (SES). Cet extrait a été réalisé à partir de 1,5 kg de crevettes de l'espèce *Penaeus monodon* provenant de Madagascar, achetées au mois de novembre et dans lesquelles l'absence d'anomalie a été observée. Les crevettes ont été broyées et centrifugées pendant 10 min à 3500 g à 04°C. Le culot constitué de carapace et de fibre a été éliminé, et le surnageant a été lyophilisé. Le lyophilisat a finalement été broyé afin d'obtenir une poudre homogène.

➤ **Extraction** : les cultures de champignons ont été réalisées en triplicata dans des erlenmeyers contenant 50 ml de milieu de culture solide. Les milieux ont été inoculés en trois points. Les cultures ont été incubées à 27°C pendant 07 à 13j à la lumière naturelle respectivement pour *Aspergillus* et *Byssochlamys*. Le milieu de culture a été co-extrait avec le mycélium afin d'inclure dans l'extrait les composés excrétés. Les extractions ont été réalisées avec 100 ml d'un mélange de dichlorométhane/acétate d'éthyle 1:1 (v/v). Le contenu de chaque erlenmeyer a été broyé et

mélangé une première fois avec le solvant d'extraction. Après 30 min de sonication le surnageant a été récupéré, et l'ensemble des résidus obtenus pour une même souche ont été alors réunis, mélangés une seconde fois avec le solvant d'extraction et l'extraction s'est faite par macération pendant une nuit. Le surnageant a été récupéré par filtration sur Büchner et regroupé avec les précédents. L'ensemble a été déshydraté avec du Na₂SO₄ anhydre, les spores ont été éliminées de la solution à l'aide de filtres de cellulose régénérée de 0,45 µm (Sartorius, Göttingen, Germany) puis évaporé à sec pour donner un extrait brut.

b- Purifications :

Diverses techniques chromatographiques analytiques et de séparation quantitative ont été faites:

- analyse en spectrométrie de masse et déréplication,
- chromatographie sur couche mince.
- analyse par RMN
- chromatographie flash pour purification de la fraction 1 nommé G10Bl-1-1 et chromatographie sur couche mince
- étude d'activité cytotoxique et antibiotique (en cours)

➤ La déréplication et analyse en spectrométrie de masse :

L'analyse a été effectuée dans le but d'avoir une connaissance de base des molécules composant les extraits bruts avant de faire une analyse de purification.

➤ La chromatographie sur couche mince (ccm) analytique :

Elle a été effectuée dans le but de savoir le nombre de composant constituant l'extrait brut à partir de la révélation de migration.

Le choix et les proportions des solvants dans les mélanges utilisés dépendent de la polarité des extraits étudiés. Les mélanges retenus ont été les suivants :

- n-hexane/ Acétate d'éthyle pour les composés très lipophile.
- dichlorométhane/ méthanol, pour les composés polaires.

Après une révélation, le mélange dichlorométhane/méthanol (50:50) a été retenu comme éluant pour faire une purification en chromatographie sur gel de silice et pour la chromatographie sur couche mince Hexane/Acétate d'éthyle (90:10).

➤ **Chromatographie flash sur gel de silice de l'extrait brut de *Byssochlamys l.* et d'*Aspergillus niger* :**

Celle-ci est effectuée dans le but d'avoir une fraction pure pour pouvoir faire de l'RMN et de savoir l'identité de la molécule qu'on veut isoler.

III- RESULTATS :

A- Résultat d'échantillonnage :

Tableau 01 : échantillonnage de crevette pour les 2 sites d'études

Année	2012		2013		2014	
	Morondava	Majunga	Morondava	Majunga	Morondava	Majunga
lieux normale	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Anomalies white spot	10,50%	0,00%	15,00%	4,50%	22,50%	10,50%
cotton	0,00%	15,00%	0,00%	13,50%	0,00%	9,00%
branchie noire	7,50%	0,00%	7,50%	0,00%	7,50%	0,00%

Comme nous constatons, les anomalies sur les crevettes gagnent de plus en plus de terrain chez nous sans parler des virus de « white spot » qui peut atteindre une mortalité de 70% en 03 jours au niveau du cheptel.

Pour le « white spot », il atteint la crevette avec 14,75% /an pendant 03 ans, et pour Majunga 04,25%/an.

Pour le cotton, cette anomalie gagne seulement Majunga avec une moyenne de 10,65%/an pendant 03 ans.

Pour la branchie noir, gagne seulement elle Morondava et reste stable pour avec une atteinte de 7,50% /an pendant 03 ans.

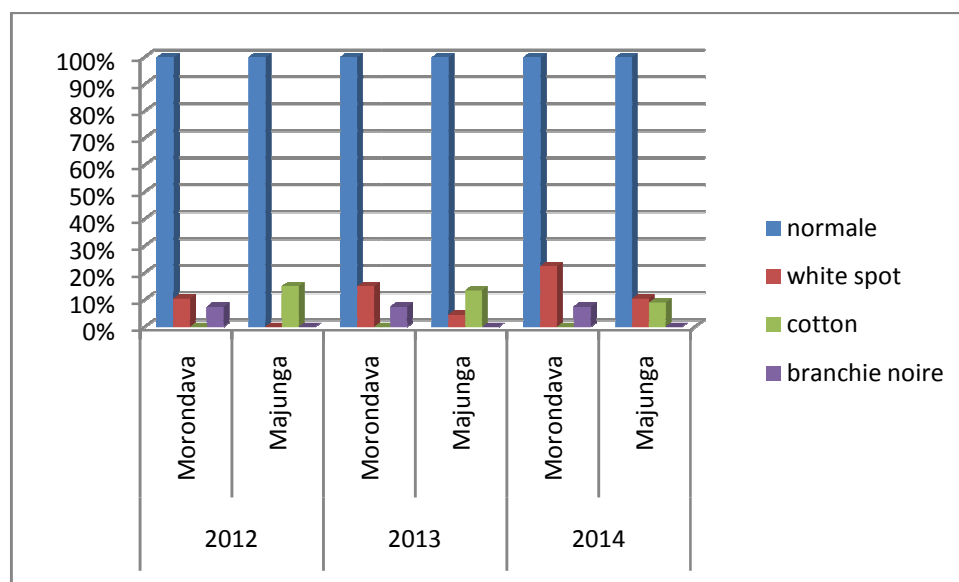


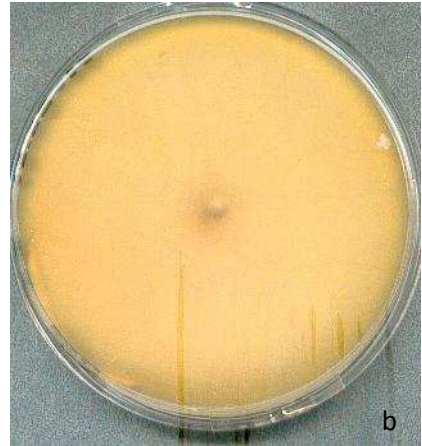
Figure 02 : représentation statistique des crevettes présentant des anomalies par rapport à la normale

B- Identification moléculaire des champignons

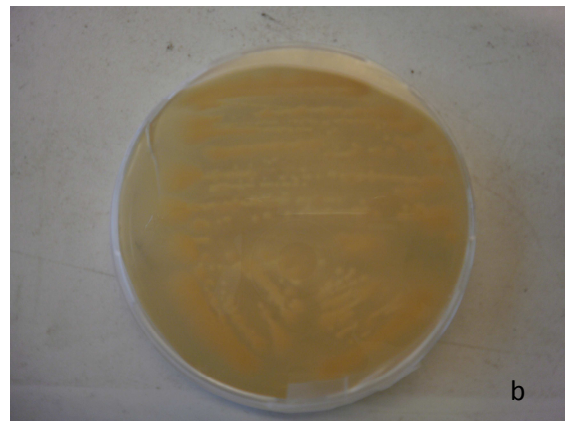
Des souches de champignons (levures et moisissures) se sont développées sur du milieu MA avec antibiotiques et aussi des bactéries.

En tout nous avons isolé 51 souches de microorganismes venant de crevettes. Parmi ses souches nous avons : 31 champignons et 20 levures résumées dans le tableau ci-dessous.

a) Photo macroscopique des levures, moisissures.



Vue macroscopique de *Byssochlamys lagunculariae* (a : Face recto ; b : face verso)



Vue macroscopique de *Lodderomyces elongisporus* (a : Face recto ; b : face verso)

b) Tableau récapitulatif des espèces trouvées dans les échantillons de crevettes :

Nom d'espèce isolée	Lieu d'échantillonnage	Signes extérieurs (pathologie)
<i>Aspergillus niger</i>	Morondava et Majunga	crevette WSSV "white spot syndrome virus" et branchie noire
<i>Byssochlamys lagunculariae</i>	Morondava et Majunga	crevettes avec de branchie noire
<i>Fusarium sp</i>	Morondava et Majunga	crevette WSSV "white spot syndrome virus" et branchie noire
<i>Candida bracarensis</i>	Majunga	présence de masse blanche sous la carapace dorsale et ventrale, nommé "cotton" ou "milk"
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	Morondava	crevettes avec des grosses têtes et branchie noire
<i>Trichosporon jirovecii</i>	Morondava	crevettes avec des grosses têtes et branchie noire
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Majunga	présence de masse blanche sous la carapace dorsale et ventrale, nommé "cotton" ou "milk"
Levure non identifiée**	Morondava et Majunga	crevettes avec des grosses têtes
Levure non identifiée		
Levure non identifiée		
Levure non identifiée		

** : levure non identifié à cause de la manque d'expertise dan le domaine de notre laboratoire

Nous avons pu identifier 07 espèces de champignons de crevettes différentes pour le moment mais il y a encore ceux non identifiés car elles sont en cours d'investigation.

C- Identification moléculaire des métabolites secondaires

Vu qu'il y a déjà beaucoup de publication sur l'*Aspergillus niger*, notre résultat concerne seulement *Byssochlamys laguncularia*

- **Analyse en spectrométrie de masse et déréplication**

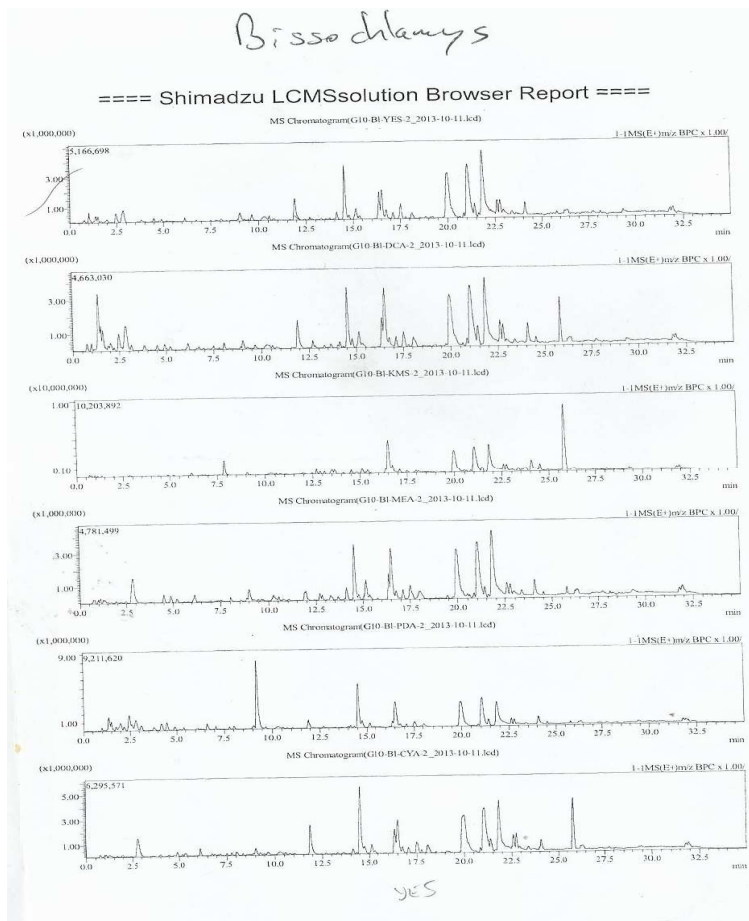
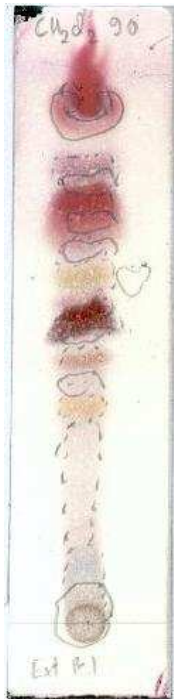


Figure 2 : analyse spectrométrie de masse et déréplication de *Byssochlamys laguncularia*

D'après la figure, en tout nous observons 10 pics, ce qui correspond normalement à 10 composés mais il faudra vérifier cela par de la chromatographie sur couche mince pour être sûr car il y a aussi les pics des solvants utilisés qui sont présents.

- **Chromatographie sur couche mince**



ccm avec éluant
Dichlorométhane/Méthanol (90 :10)



ccm avec éluant Hexane/Acetate d'éthyl
(80 :20)

Figure 3 : chromatographie sur couche mince d'extrait brut de *Byssochlamys laguncularia*

Pour la ccm, le mélange éluant Dichlorométhane/Méthanol a apporté une bonne séparation des composés dans l'extrait brut. Ici on voit 13 constituants selon la migration. Par contre pour l'éluant Hexane/Acetate d'éthyl, la migration a eu lieu mais ne permet pas d'avoir une bonne séparation des composés.

Pour la suite de l'analyse, c'est l'éluant (Dichlorométhane/Méthanol) qui a été utilisé lors de la purification par chromatographie sur gel de silice de l'extrait brut de *Byssochlamys l.* et la ccm par la suite.

- **Chromatographie sur couche mince de la purification de l'extrait brut de *Byssochlamys l.***

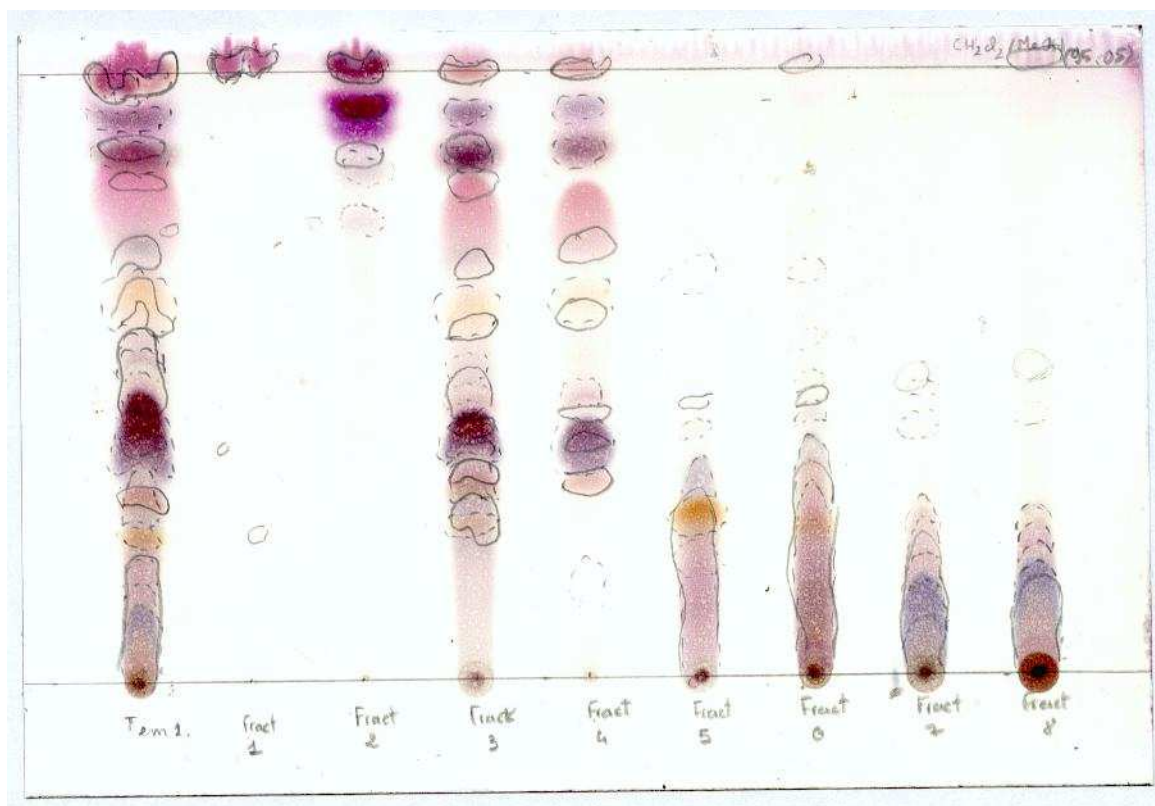


Figure 04: chromatographie sur couche mince de la fraction issue de chromatographie sur gel sephadex

Notre choix a été fixé sur les toutes les fractions qui ont migré étant donné qu'il n'y a pas encore de recherche très approfondie sur la souche et qu'à partir des prospections toutes les molécules sont très réputées pour leur toxicité intense surtout au niveau des humains.

- **Test d'activité des fractions :**

Après un test d'activité très vague, la fraction 1 qui est très lipophile avait une activité sur PPARgamma (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma) c'est un récepteur qui régule la stockage d'acide gras et de métabolisme du glucose.

- **chromatographie flash de la fraction G10BI-1-1**

Dans la figure ci-dessous, nous avons pu récolter 74 tubes qui vont servir pour la suite à la chromatographie sur couche mince.

Après, nous allons rassembler les tubes avec la fraction présentant la même vitesse de migration pour être évaporée et avoir une fraction pure.



Figure 05 : graphe de chromatographie sur flash

- **Chromatographie sur couche mince des 74 tubes :**

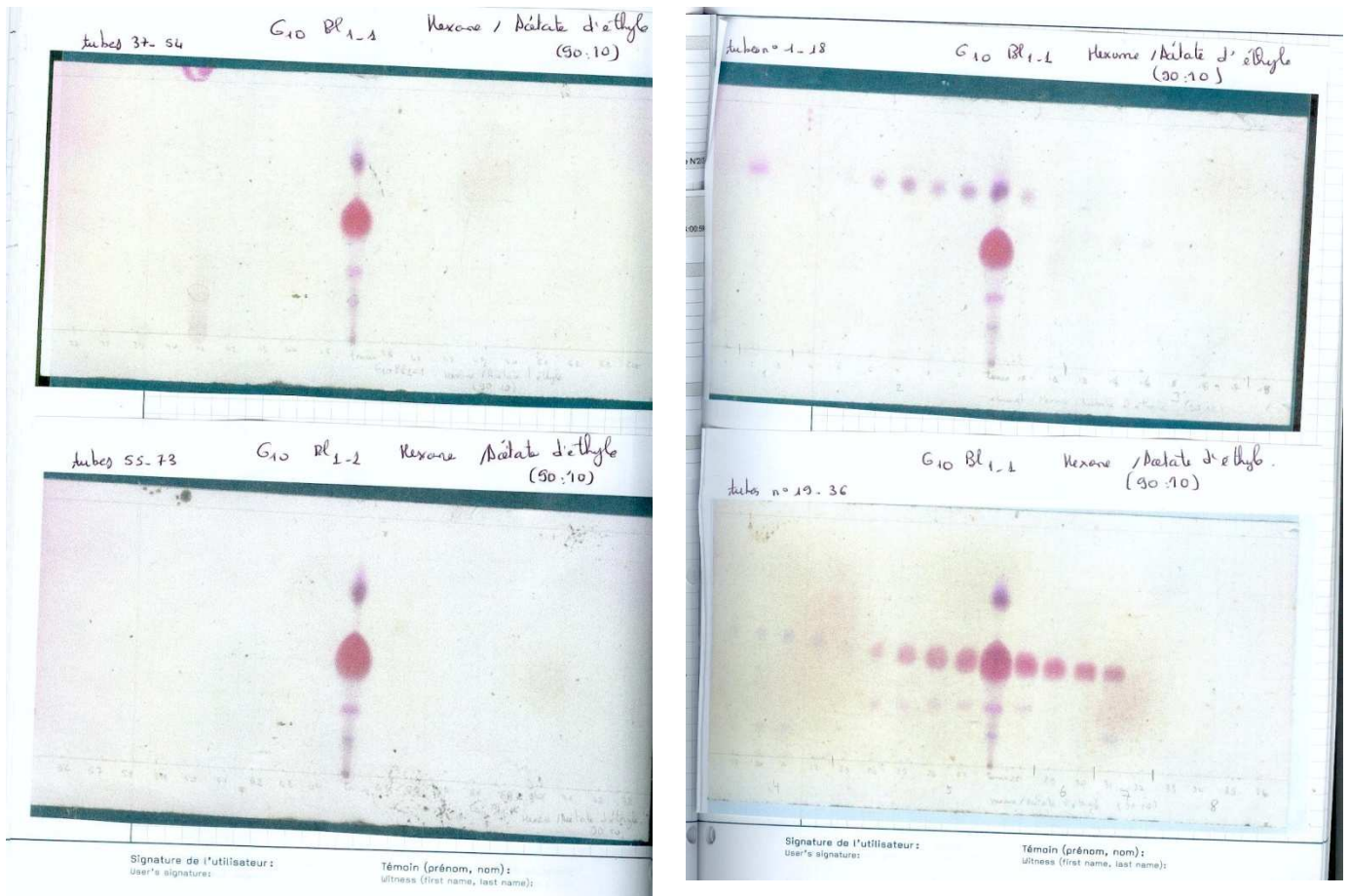


Figure 06: chromatographie sur couche mince des 74 tubes issus de la chromatographie flash

D'après les figures, nous avons rassemblés les fractions suivantes pour avoir 07 fractions pures et ensuite évaporation :

Fraction G10B14-1 : Tube n° 02-03

Fraction G10B14-2 : Tube n° 04-11

Fraction G10B14-1 : Tube n° 12-17 et n°23-28

Fraction G10B14-1 : Tube n° 18-22

Fraction G10B14-1 : Tube n° 29-30

Fraction G10B14-1 : Tube n° 31-32

Fraction G10B14-1 : Tube n° 33-74

- **Résultat de la Chromatographie sur couche mince des fractions pures**

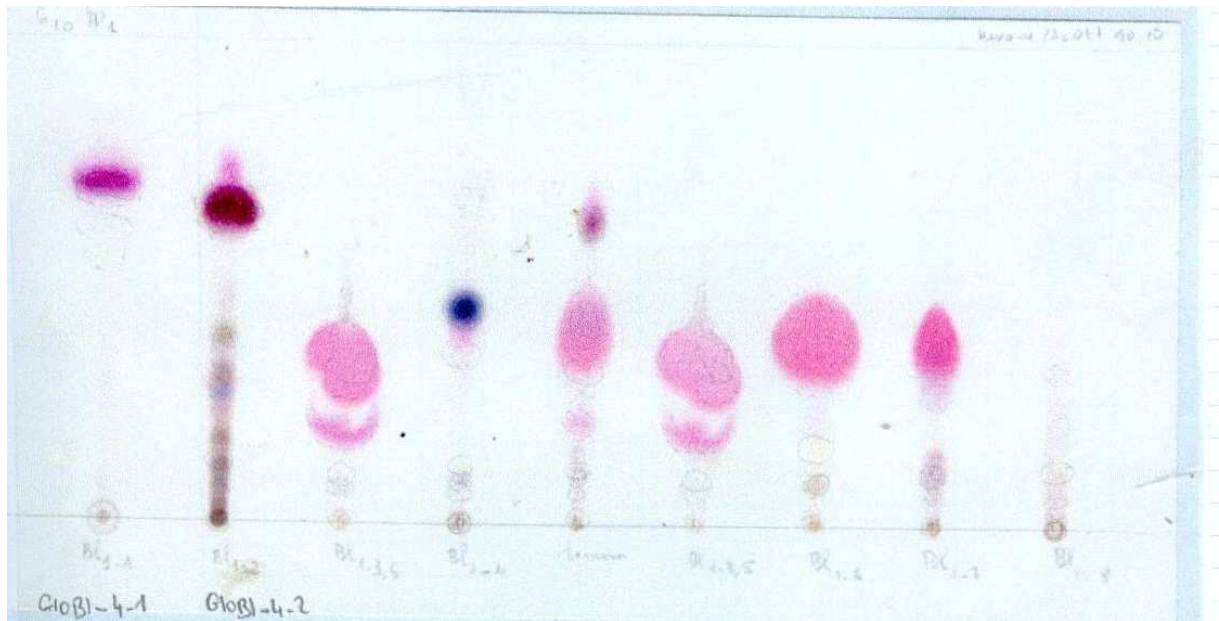


Figure 07: chromatographie sur couche mince des fractions pures issues

Selon la base de données, le composé de couleur bleu sur la CCM est de la griséofulvine (reste à vérifier sur l'RMN et l'HPLC-spectrométrie de masse)

- Le résultat de l'HPLS-LCM est en cours de traitement, mais il y a deux composés que nous avons pu identifier jusqu'à maintenant c'est la griséofulvine en bleu sur la CCM et l'onicotine.

IV- DISCUSSION :

A- Collecte d'échantillon :

Comme nous constatons, les anomalies sur les crevettes gagnent de plus en plus de terrain chez nous sans parler des virus de « white spot » qui peut atteindre une mortalité de 70% en 03 jours au niveau du cheptel. Le fait que les crevettes présentent des branchies noires était dû à la présence d'*Aspergillus niger*.

Mais la question pour nous c'est comment utiliser les armes « mycotoxines » des microfunges pour lutter contre les virus étant donné qu'ils ont été isolés de crevettes présentant ces anomalies là ? Notre étude est axée sur ce thème en ce moment pour la troisième année de thèse

B- Identification moléculaire des souches de microfunges

D'après les recherches bibliographiques, seulement le genre *Aspergillus niger* a été isolé des crustacés plus précisément des crevettes adultes (Lidiane Roberta Cruz da Silva et al. 2011). Mais les autres ont été isolées des substrats (supports) végétaux, alimentaires (SPLITTSTOESSER et al. 1970 ; Dae-Hyung Lee et al. 2008), animaux (T. DEAK et al. 2000) et même humain (Shawn R. Lockhart et al. 2009).

Les souches que nous avons isolées présentent toutes la capacité de produire des mycotoxines surtout les souches *Aspergillus niger*, *Byssochlamys lagunculariae* et *Candida bracarensis*.

Le genre *Aspergillus niger* est une souche extrêmement puissante dans la production de mycotoxine. Ces mycotoxines sont généralement toxiques pour les animaux et les humains (Ajay K. et al 2011).

A. niger a une propriété d'altération et de production de métabolites secondaires, telles que les aflatoxines, ochratoxines et fumonisine (Abracas et al, 1994; Noonimabc et al, 2009) qui sont toxiques. La fumonisine B2 mycotoxines a été récemment découvert produit par *A. niger* (Noonimabc et al., 2009)

Byssochlamys lagunculariae, une souche thermo-résistante est décrite comme capable de produire un certain nombre de métabolites secondaires toxiques, tels que la byssotoxin A, l'acide byssochlamic (Samson et al. 2009 ; Kramer et al. 1976, Rice et al., 1977) ainsi que de l'acide mycophénolique ; l'agent cancérigène, la patuline, les substances tremorgenic, fumitremorgin A et C, et verruculogen; Fischerin, qui a causé une péritonite mortelle chez la souris; et eupenifeldin, un composé possédant une cytotoxicité, ainsi que de l'activité antitumorale in vivo. (V Tournas, 1994)

Morphologiquement et chimiquement, *B. lagunculariae* est similaire à *B. nivea* mais avec des caractères de taux de croissance différents et la non production de patuline (Samson et al. 2009). *B. lagunculariae* produit le même profil global d'extrolite que *B. nivea*, sauf que la patuline n'a pas été détectée dans l'espèce ancienne (Samson et al. 2009).

Etant donné que *B. lagunculariae* a été isolé de crevette, le doute se pose est ce que cette espèce produit vraiment ou pas de patuline. Cela sera vérifié lors de la caractérisation chimique des métabolites secondaires de ces microfunges (voir résultat sur identification moléculaire des métabolites secondaire)

Les souches non identifiées sont des bactéries, ils sont de très petites colonies par observation macroscopique et microscopique ont eu du mal à pousser sur du MA chloramphénicol et mises sur du YPD (yeast-peptone-dextrose agar) se sont développées rapidement.

L'isolement de toutes ces souches à partir des crustacés est délicat du point de vue commercial et peut avoir des répercussions sur la sécurité alimentaire car certains consommateurs préfèrent consommer les produits de la mer crus surtout les crevettes.

C- Identification moléculaire des métabolites secondaires :

D'après les résultats provisoires, les métabolites actifs de la souche *Byssochlamys laguncularia* est très intéressante par l'activité sur le PPAR gamma et aussi la présence de griséofulvine qui est un antifongique puissant sans parler des données (tests de neurotoxicité et de cytotoxicité) qui sont en cours d'investigation.

V- CONCLUSION ET PERSPECTIVES :

En tous nous avons pu isolés 07 espèces (*Aspergillus niger*, *Byssochlamys lagunculariae*, *Candida bracarensis*, *Fusarium sp* *Lodderomyces elongisporus*, *Trichosporon jirovecii* et *Yarrowia lypolitica*) de champignons de crevettes différentes pour le moment mais il y a encore ceux non identifiés car elles sont encore non purifiées.

D'après les résultats et notre choix de souche pour y travailler, *Aspergillus niger* et *Byssochlamys lagunculariae* sont très intéressants du point de vue production de métabolites secondaires et entre les deux seulement le genre *Aspergillus niger* à été signalés isolé des crustacés et l'autre non.

Vu que nous avons travaillé seulement sur la souche *Byssochlamys lagunculariae* les résultats sont très prometteurs. Ils sont encourageants et incitent à faire une étude plus poussée sur les fractions actives ainsi que de avoir les relations qu'ils entretiennent avec l'hôte. Cela va nous permettre d'établir plus tard la relation entre les microorganismes et son hôte et de comprendre par la suite le fléau qui frappe les crevettes dans notre pays en informant les aquaculteurs du danger ou/et de l'atout de l'existence des ces microfonges au niveau du cheptel.

En bref, notre recherche et notre investigation sur ces métabolites continue toujours pour une perspective de sortie de nouveau outil de recherche en laboratoire pour nos crevettes voir même des candidats pour des prochains médicaments sur le marché mondiale. L'existence de nouvelles molécules en vue est probable qui pourraient être des candidats potentiels pour l'avenir de la recherche.

REMERCIEMENTS :

Le travail a été mené à bien grâce à l'appui financier du Gouvernement Français par le Projet PARRUR, Muséum national d'histoire naturelle de Paris et de l'MMS IsoMer à Nantes (pour les expérimentations)