

Recherche d'un milieu synthétique pour la croissance et la toxicogénèse des *Aspergillus* du groupe *flavus*

par J. JACQUET et A. TANTAOUI-ELARAKI

L'un des problèmes pratiques, bien qu'il sous-entende des connaissances théoriques, et qui se pose constamment aux microbiologistes, est l'obtention des meilleures cultures possibles. Avec les espèces toxicogènes, il faut ajouter la production maximale du poison. Et, les conditions idéales de l'un et l'autre phénomène ne sont pas forcément les mêmes.

En 1967, avec BOUTIBONNES (5), nous avons abordé le cas des *Aspergillus flavus*. Il nous a paru utile de développer cette question qui n'avait été, à l'époque, explorée que sommairement, d'autant plus que de très nombreux travaux y ont été consacrés, par ailleurs.

Une grande variété de milieux naturels ou semisynthétiques ont été essayés avec des succès divers ; mais, leur nature complexe et mal définie rend impossible l'étude du rôle exact de tel ou tel composant. On a donc tenté, parallèlement, la mise au point de milieux entièrement synthétiques déjà utilisés antérieurement pour d'autres objets (5, 6, 8, 12, 15, 18), ou nouvellement préparés dans le but précis, cette fois, de favoriser la toxicogénèse des *Aspergillus* (1, 5, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 17, 18). Mais, de l'avis même des auteurs, la plupart n'atteignent pas le pouvoir inducteur des représentants des premiers groupes, ou ne le dépassent pas, les deux mélanges que nous avons constitués (5) se rangeant dans cette catégorie. Depuis, nous avons employé les mélanges lait-Czapeck, et surtout lait-crème, qui nous ont permis d'obtenir jusqu'à 2 g par l de toxique, avec une souche particulièrement bonne productrice, le record étant tenu par le lait de coco sur lequel ARSECULE-RATNIE et coll. (3) ont pu avoir jusqu'à 8 g par l d'aflatoxine. Mais, le potentiel génétique de la souche utilisée intervient fortement et nous n'avons, avec ce produit, jamais pu constater de telles teneurs. Le milieu de REDDY et coll. (17), permet, de son côté, une production, appréciable.

Nos efforts actuels ont porté, d'abord, sur une tentative analytique pour connaître les effets de différentes substances, ensuite sur une réalisation synthétique. Accessoirement, dans une perspective d'utilisation nouvelle du lactosérum de fromagerie comme milieu de culture général, nous avons regardé son comportement à l'égard des *Aspergillus*. C'est par ce point que nous commencerons.

I. — SOUCHES UTILISÉES

Le tableau joint donne les origines et les caractéristiques de production de flavacoumarine B₁, sur trois milieux différents, des souches dont nous nous sommes servis dans notre étude.

Désignation	Origine	Pouvoir toxicogène : teneur en aflatoxine en mg par l	Milieu utilisé
1	Souche Batista (collection)	0	1
2	Carottes moisies (France)	41,60	1
3	Pain (Casablanca Maroc)	0,26	1
4	Pain (Casablanca Maroc)	0,26	1
5	Orge (Maroc)	65	2
6	Mais (Maroc)	260	2
7	Fèves (Maroc)	260	2
8	Coriandre (Maroc)	260	2
9	Coriandre (Maroc)	78	3
10	Paprika (Maroc)	0,52	3
11	Arachides de Bamako (Mali)	10,40	1
12	Terre (Fort Lamy, Tchad)	0,26 (4)	1
13	Blé (Farcha : Tchad)	13	1
14	Terres (Algérie)	26	3
15	— —	13	3
16	— —	26	3
17	— —	52	3
18	— —	13	3
19	— —	1,30	3
20	— —	78	3
21	— —	260	3
22	— —	0,52	3
23	— —	52	3

1 : sur milieu constitué de lait entier : CZAPECK-DOX (4 : 1, v : v).

2 : sur solution saline de CZAPECK contenant 100 g de saccharose et 20 g d'extraits de levures Difco par l.

3 : sur lait entier enrichi de crème fraîche (20 g de crème pour 100 ml de lait).

(4) Cette souche seule parmi celles indiquées sur le tableau joint, formait un mélange des difuranocoumarines B₁ et G₁, les autres ne formant que de la flavacoumarine B₁.

II. — TENTATIVE D'EMPLOI DU LACTOSÉRUM DE FROMAGERIE APRÈS HYDROLYSE DU LACTOSE

L'ensemencement est fait en flacons d'ERLENMEYER renfermant, soit, du lactosérum stérile, soit, du lactosérum dont le lactose a été hydrolysé par la β -galactosidase extraite de *Saccharomyces lactis*. Les *A. flavus* utilisant mal le lactose, on pouvait espérer obtenir une meilleure croissance après remplacement du sucre de lait par le mélange glucose-galactose. En fait, à 20 °C, la plupart des mycéliums poussent assez mal dans les premiers jours, le développement s'accéléralant beaucoup vers le 10^e jour, puis, tendant à se ralentir ensuite. Les différences entre les deux milieux sont assez faibles, mais, en faveur du produit délactosé. Avec d'autres espèces (*Penicillium pulverulentum*, *Mucor hiemalis* et *Geotrichum candidum*), les différences sont beaucoup plus nettes.

Notons, au passage, que beaucoup de bactéries ont des croissances considérablement améliorées sur ce sous-produit après hydrolyse du lactose.

III. — CROISSANCE MAXIMALE DES *ASPERGILLUS FLAVUS*

Nous avons, au milieu classique de CZAPECK-DOX, fait des adjonctions et des substitutions, à l'aide de 27 glucides ou polyalcools (aux concentrations de 1 p. 100, 3 p. 100, 5 p. 100, et 10 p. 100), et 21 acides aminés, sans compter quelques sels minéraux.

En ce qui concerne les glucides, 108 compositions différentes ont été étudiées, sur milieux distribués à raison de 10 ml dans des Erlenmeyer de 100 ml, inoculés à raison de V gouttes d'une suspension de spores dans de l'eau physiologique, contenant 0,01 p. 100 de Triton X 100. Après 7 jours d'incubation à la température ambiante et pesée du mycélium obtenu, sur les souches 1, 3, 4, 11, 12 et 13, les résultats ont été les suivants :

— le meilleur glucide est, sans conteste, le glycogène. Puis viennent l'amidon soluble, le mannose, le maltose, le cellobiose, ensuite, le fructose, le saccharose, enfin, proches des glucides, le sorbitol et l'inositol.

Le lactose convient mal, ce qui confirme MATELES et ADYE (14), DAVIS et coll. (7), et correspond à nos essais du paragraphe II.

De différents sels organiques de sodium (citrate, tartrate, pyruvate, acétate, hippurate), seul, le dernier permet une faible croissance.

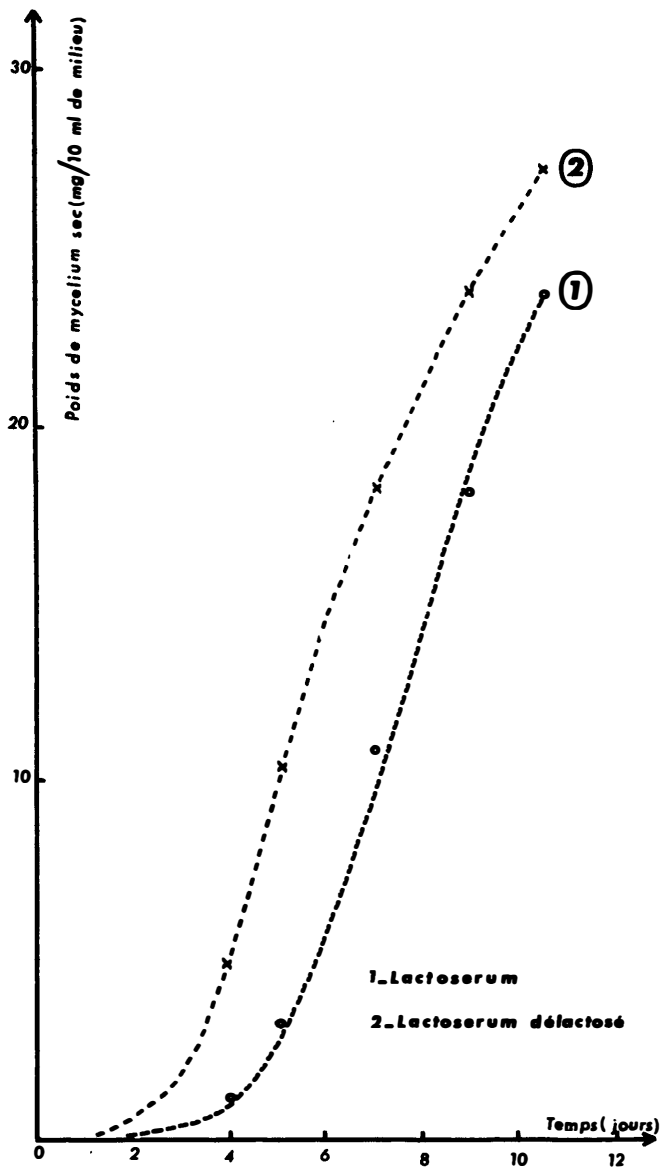


FIG. 1. — Croissance comparée d'une souche d'*Aspergillus flavus* sur lactosérum ordinaire ① et sur lactosérum hydrolysé par la lactase (β -galactosidase) extraite de *Saccharomyces lactis* ②.

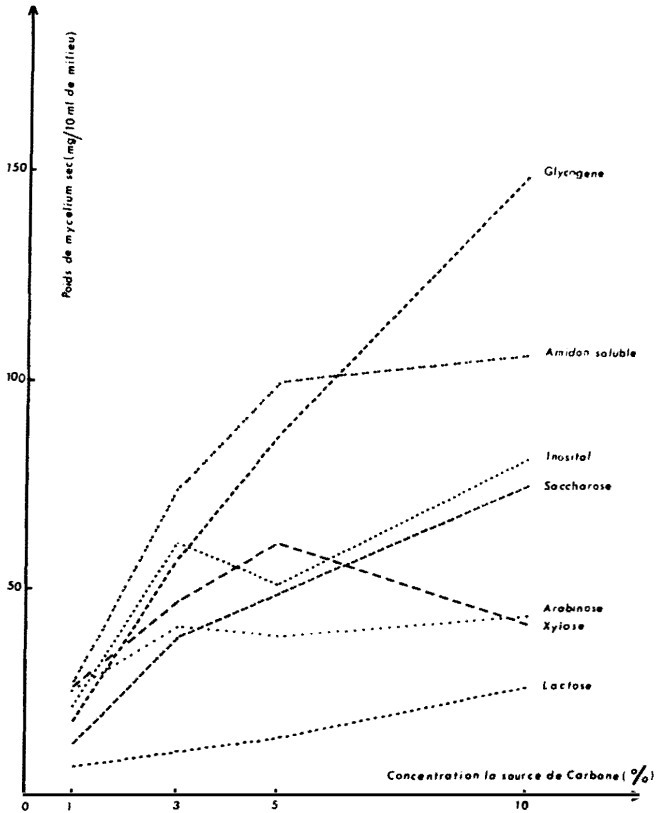


FIG. 2. — Action de différents glucides et alcools, dans le milieu CZAPECK-DOX, sur la croissance des *Aspergillus flavus*.

Les courbes de croissance (poids du mycélium sec en fonction de la concentration) présentent 3 types différents (fig. 2) :

a) courbe croissante pour les teneurs de 1 à 5 p. 100 et décroissante de 5 à 10 p. 100 : xylose, glycérol, hippurate de sodium,

b) courbe croissante de 1 à 3 p. 100, décroissante de 3 à 5 p. 100 et à nouveau croissante entre 5 et 10 p. 100 : inositol, raffinose et arabinose,

c) courbe régulièrement croissante de 1 à 10 p. 100 : les autres glucides, avec, en tête, le glycogène.

Parmi les acides aminés et dérivés, essayés avec les souches 2 et 11, certains ne donnent qu'un développement moyen ne dépassant

pas celui du milieu témoin, constitué de Czapeck-Dox sans nitrate de sodium : alanine, valine, thréonine, lysine, cystéine, cystine et histidine. Pour d'autres, l'effet dépend étroitement de la concentration, ce qui explique beaucoup de divergences dans les résultats des uns et des autres : le glyocolle, la leucine, la méthionine et la proline, font former une plus grande quantité de mycélium à 5 p. 1.000 qu'à 3 p. 1.000. Au contraire, l'arginine et le tryptophane sont meilleurs à 3 p. 1.000. Mais, c'est la sérine, la tyrosine, la glutamine et l'asparagine qui favorisent le mieux la production du thalle.

IV. — PRODUCTION MAXIMALE DE FLAVACOUMARINE

a) *Rôle inducteur direct.*

Dans un premier temps, nous avons cherché les substances qui, ajoutées à un milieu jamais inducteur par lui-même de la toxicogénèse (milieu de CZAPECK-DOX sans sucre) pouvaient le rendre actif. 5 souches toxicogènes étaient utilisées dans cette étude : les souches 3, 4, 11, 12 et 13. Aucune des 108 combinaisons de glucides étudiées précédemment n'est efficace. Donc, aucune de ces sources de carbone n'a d'effet sur la synthèse de l'aflatoxine.

De même, peu d'amino-acides induisent directement la toxicogénèse ; sont actifs, seulement, le glyocolle, l'acide aspartique, la proline, le tryptophane. La phénylalamine et la tyrosine ont un effet très faible, sinon douteux.

Les protéines plus complexes, telles que la trypticase et la peptone pancréatique de fibrine, les extraits de levure, sont bien meilleurs. L'hémoglobine à 5 p. 100 et la mucine à 3 p. 100 agissent, quoique faiblement. L'urée, l'acide nucléique de levures, la gélatine, la protéose peptone n° 3 de DIFCO, n'ont aucune action.

Nous confirmons, en revanche, l'effet considérable de l'ion Zn (2, 7, 13, 14, 16) à l'une quelconque des concentrations de 0,4-0,8 ou 2 parties par million (*).

b) *Rôle favorisant dans un milieu déjà inducteur.*

Dans un milieu déjà inducteur par lui-même, de nombreux facteurs peuvent avoir un rôle adjuvant, parfois très puissant, pour aboutir à un ensemble plus dynamique que tel ou tel composant pris isolément.

(*) ppm.

Nous avons ajouté à un milieu actif (solution saline de CZAPECK-Dox enrichie de 2 p. 100 d'extraits de levure) les différentes sources de carbone précitées au taux de 10 p. 100. Dans un tri préliminaire, à l'aide des souches 2 et 11, nous les avons réparties en 4 catégories :

1) glucides qui favorisent la toxicogénèse, faisant fabriquer au moins 10 fois plus de toxique qu'en leur absence : xylose, glucose, mannose, fructose, saccharose, maltose et raffinose.

Avec les souches 5, 6, 7 et 8, nous avons classé, ensuite, ces substances entre elles : le mannose excite 187 fois plus la synthèse de la flavacoumarine que le témoin, le saccharose 150 fois, le glucose 112 fois, le maltose 92 fois, le fructose 57 fois, le raffinose 41 fois et le xylose 7 fois.

Les résultats démontrent, encore une fois, que les phénomènes de croissance et de toxicogénèse sont bien dissociés, ce qui s'explique très bien dans le cas des *A. flavus*, la production du toxique commençant lors de l'apparition des conidies.

Parallèlement, au milieu de CZAPECK-DOX, dépourvu de nitrate de soude (puisque nous recherchons l'effet des formes de l'azote) et additionné de sulfate de zinc (à 1 ppm de zinc), nous avons ajouté différents acides aminés au taux de 5 p. 1.000. Nous retrouvons l'activité des corps déjà cités au paragraphe précédent (IV, a) D'autres doivent être mis sur la liste des substances efficaces, alors qu'ils n'agissaient pas du tout en l'absence du zinc. Ce sont l'acide glutamique, l'arginine, la glutamine, l'asparagine. Et, ce dernier corps est le plus remarquable de tous.

2) sources de carbone qui semblent n'avoir aucun effet sur la toxicogénèse, ou qui la favorisent très peu : arabinose, galactose, cellobiose, tréhalose, lactose, amidon soluble, glycogène, glycérol et sorbitol.

3) glucides qui provoquent une légère inhibition, donnant moins d'aflatoxine que le témoin : inuline.

4) sources de carbone qui inhibent totalement la toxicogénèse : rhamnose, mannitol, dulcitol et inositol.

Bien entendu, ce sont les combinaisons de plusieurs effets qui se montrent supérieures :

— pour les oligo-éléments, dans la solution de CZAPECK-DOX, contenant 10 p. 100 de saccharose, 5 p. 1.000 d'asparagine et 1 ppm de zinc, nous introduisons d'autres ions à raison de 1 ppm également. Avec les souches 6, 7 et 8, le manganèse, et surtout le cobalt, activent la synthèse de l'aflatoxine. Le baryum et le cuivre ont

un effet inhibiteur et le cobalt, le cuivre et le manganèse rassemblés ralentissent la formation du dérivé coumarinique ;

— pour la réunion des sources de carbone et d'azote, et avec les mêmes moisissures, les mélanges les plus intéressants ont été le couple saccharose-asparagine, suivi par le mannose-glycocolle et le mannose-arginine.

Compte tenu des résultats ci-dessus, nous proposons l'emploi du milieu, très favorable à l'aflatoxicogénèse des *Aspergillus* :

Saccharose	100	g
Asparagine	5	g
Nitrate de sodium	3	g
Phosphate bipotassique	1	g
Sulfate de magnésium	0,5	g
Chlorure de potassium	0,5	g
Sulfate de fer hydraté, 7 H ₂ O	0,01	g
Sulfate de zinc	0,002 5	g
Nitrate de cobalt	0,000 3	g
Eau	1.000	g

12 souches toxigènes d'*A. flavus* (9, 11, et 14 à 23) ont été ensemencées comparativement sur ce milieu, sur celui de REDDY et coll. (17) et sur le mélange lait entier homogénéisé enrichi de crème fraîche (20 g pour 100 ml de lait) (10). La culture est effectuée en tubes roulants (5 ml de milieu par tube) à 22-23 °C, procédé rapide dont BOUTIBONNES a, précédemment montré l'intérêt (4). Les proportions de flavacoumarine obtenues sont respectivement de 10,59-37,54 pour les préparations anciennes et 100 pour la nouvelle.

V. — DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Après une expérience de plusieurs années et l'étude de près de 1.000 clones d'*Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* (11), nous confirmons certaines des notions mises en évidence dès 1967 :

— il y a des souches qui sont, génétiquement, toxigènes, et d'autres qui ne le sont jamais : mais, les premières ne révéleront leur pouvoir qu'en présence d'un substrat inducteur ;

— les composants qui favorisent le plus la croissance ne sont pas forcément les meilleurs pour l'expression de la toxicogénèse.

Nous proposons un milieu synthétique comme propre, dans la majorité des cas, à faire produire le plus d'aflatoxine possible. Il n'est sûrement ni parfait, ni définitif, car il faut tenir compte de la variabilité de succès des substrats inducteurs d'une souche à l'autre : pour le zinc, par exemple, c'est la concentration de 0,8 ppm qui est la plus favorable pour la souche n° 11, aussi bien pour la sporulation que la toxicogénèse et la formation du pigment. Au contraire, la souche n° 2 s'accommode beaucoup mieux de 2 ppm. De même, le couple saccharose-asparagine est nettement supérieur pour la plupart des souches, mais une souche (n° 5) produit, cependant, plus d'aflatoxine avec le mannose-glycocolle et le saccharose-arginine. Il y a donc lieu de poursuivre encore les recherches. De toutes façons, on ne peut pas parler d'un pouvoir toxicogène « en soi » : il ne peut être compris qu'en fonction d'un milieu donné. Et encore, la variabilité possible de l'inoculum, puisque nous avons montré la répartition gaussienne de potentiel toxicogène des clones issus de cultures monospores (11), doit encore intervenir.

*Laboratoire de Microbiologie et
Institut du Lait, des Viandes et de la Nutrition.*

BIBLIOGRAPHIE

1. ADYE (J.) et MATELES (R.). — Incorporation of labelled compounds into aflatoxins. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1964, **86**, 418.
2. AMBRECHT (B.), HODGES (F.), SMITH (H.) et NELSON (A.). — Mycotoxins. I. Studies on aflatoxin derived from contaminated peanut meal and certain strains of *Aspergillus flavus*. *J. Assoc. Offic. Agr. Chem.*, 1963, **45**, 805-817.
3. ARSECULERATNIE (S.), DE SILVA (L.), WIJESUNDERA (S.) et BANDUNATHA (C.). — Coconut as a medium for the experimental production of aflatoxins. *Appl. Microbiol.*, 1959, **18**, 88-94.
4. BOUTIBONNES (P.). — Recherches sur les *Aspergillus*. *Rev. Immunol.*, 1969, **33**, 177-227.
5. BOUTIBONNES (P.) et JACQUET (J.). — Recherches sur la production de toxine par *Aspergillus flavus*. *Bull. Acad. Vét.*, 1967, **40**, 393-403.
6. BRIAN (P.), DAWKINS (S.), GROVE (A.), HEMMING (H.), LOWE (D.), et NORRIS (G.). — Phytotoxic compounds produced by *Fusarium equiseti*. *J. Exptl Botany*, 1961, **12**, 1-12.
7. DAVIS (N.), DIENER (U.) et AGNIHOTRI (V.). — Production of aflatoxine B₁ and G₁ in chemically defined medium. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 1967, **31**, 251-256.
8. DE IONGH (H.), BEERTHUIS (R.), VLES (R.), BARETT (C.), et ORD (W.). — Investigation of the factor in groundnut meal responsible for « Turkey X Disease ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, **65**, 548-551.

9. GUPTA (S.), VISWANATHAN (L.) et VENKITASUBRAMANIAN (T.). — A comparative study of toxigenic and non-toxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Journal of gen. microb.*, 1971, **65**, 243-247.
10. JACQUET (J.), et BOUTIBONNES (P.). — Fluorescence des aflatoxines et des *Aspergillus*. *C. R. Soc. Biol.*, 1969, **163**, 2289-2293.
11. JACQUET (J.), TANTAOUI ELARAKI (A.), et BOUTIBONNES (P.). — Sur le pouvoir toxicogène des *Aspergillus flavus* producteurs d'aflatoxines. *C. R. Acad. Agric.*, 1975, **61**, 374-380.
12. LAFONT (A.). — Production of *Aspergillus* toxins *in vitro* (Abstr.), London, 1 p. processed. Presented at the U. N. I. C. E. F. meeting on groundnut toxicity problems, at Tropical products Inst., oct. 28, 1963.
13. LEE (E.), TOWNSLEY (P.) et WALDEN (C.). — Effect of bivalent metals on the production of aflatoxins in submerged culture. *J. Food Sci.*, 1966, **31**, 432-436.
14. MATELES (R.) et ADYE (J.). — Production of aflatoxins in submerged culture. *Appl. Microbiol.*, 1965, **13**, 208-211.
15. MATELES (R.) et WOGAN (G.). — Aflatoxins in « Advances in microbial physiology ». *New York, Academy*, 1967, **1**, 25-37.
16. NESBITT (B.), O'KELLY (J.), SARGEANT (K.) et SHERIDAN (A.). — Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*, 1962, **195**, 1062-1063.
17. REDDY (T.), VISWANATHAN (L.) et VENKITASUBRAMANIAN (T.). — High aflatoxin production on a chemically defined medium. *Applied microb.*, 1971, **22**, 393-396.
18. ZIJDEN VAN DER (A.), BLANCHE KOELENMID (W.), BOLDINGH (L.), BARRET (C.), ORD (W.) et PHILP (T.). — Isolation in crystalline form of a toxin responsible from Turkey X disease. *Nature*, 1962, **195**, 1060-1072.

M. PERREAU intervient.
