



Universitat de Lleida

## **Mycotoxines et champignons mycotoxinogènes dans les grains de sorgho commercialisé en Tunisie: Incidence et profils écophysiologicals**

Amani Lahouar

<http://hdl.handle.net/10803/400373>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



REPUBLIQUE TUNISIENNE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir  
Ecole Doctorale : Sciences Biologiques, Biotechnologie et Santé

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES BIOLOGIQUES ET  
BIOTECHNOLOGIE

**Mycotoxines et champignons mycotoxinogènes dans  
les grains de sorgho commercialisé en Tunisie :  
Incidence et profils écophysiologiques**

Réalisée par : **Amani Lahouar**

**Soutenu le 2 juin 2016**

**Membres de jury :**

**Président de jury :** Pr. Abderaouf Kenani, Professeur universitaire

**Rapporteur :** Mme Naïma Boughaleb, Maître de conférences

**Rapporteur :** Pr. Antonio Javier Ramos Girona, Professeur universitaire

**Examineur :** Pr. Sonia Marin Silué, Professeur universitaire

**Directeur de thèse :** Pr. Salem Saïd, Professeur universitaire

**Co-Directeur de thèse :** Pr. Vicente Sanchis Almenar, Professeur universitaire

Laboratoire d'accueil : Unité de Mycotoxicologie, Laboratoire de Biochimie, Faculté de  
Médecine Sousse

Laboratoire de Mycologie Appliquée, Département de Technologie des Aliments

**Année universitaire : 2015-2016**

*Tout d'abord, je remercie Dieu, le Généreux qui a enseigné  
l'homme ce qu'il ne savait pas.*

## *Dédicace*

*Je dédie affectueusement ce mémoire,*

*A mes parents aux quels je dois tout.*

*Mon honneur est de vous prouver ma grande  
affection et mon éternel dévouement.*

*A mon frère.*

*A mes cousins et mes cousines.*

*A ma famille.*

*A tous mes amis.*

*A tous ceux qui me sont chers.*

*Que votre vie soit couronnée de succès et de bonheur.  
Que Dieu vous protège, vous procure santé, réussite et  
longue vie.*

## *Remerciements*

*Au terme de ce travail, je remercie Monsieur Salem Saïd, Professeur universitaire à la faculté de Médecine de Sousse, pour avoir dirigé ce mémoire, pour son encadrement, sa disponibilité et ses conseils très précieux qui m'ont beaucoup aidé à surmonter les difficultés. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements d'avoir suivi et orienté ce travail.*

*Je remercie vivement Monsieur Vicente Sanchis Almenar, Professeur universitaire à l'Université de Lleida, pour l'accueil bienveillant au sein du Département de technologie des aliments de l'Université de Lleida, pour avoir dirigé cette thèse et pour la confiance qu'il m'a constamment témoignée.*

*J'exprime mes remerciements à Messieurs Abdraouf Kenani, Antonio Ramos Girona, Naïma Boughaleb et Sonia Marin Silué qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.*

*J'aimerais adresser ma profonde gratitude à Madame Fatma Balloumi, Technicienne supérieure au laboratoire de biochimie, pour sa disponibilité, sa gentillesse, ses conseils et ses encouragements qui m'ont beaucoup aidé pendant mon stage.*

*J'exprime toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements pour mes chères amies Ines Jedidi, Hanen Boulaïki et Khouloud Lajmi pour l'ambiance amicale qu'elles ont su créer et leur sympathie.*

*Ma reconnaissance s'adresse également à mes chères amies Mouna Cuchari, Imen Fekih, Esther Garcia, Cyndia Gonzalez, Daiana Garcia, Jordi Vidal, Fernando Lopez, Janeth Rodriguez, Marines Guerra, Rogelio Sanchez, Maria Casanovas, Maria bernarda Colonel, Miguel Angel Indignoo et Juana Mosele et tous mes amis de l'Espagne ;*

*Il m'est particulièrement agréable d'adresser un remerciement très chaleureux à Mme Montse Prime Latorre, Technicienne au Laboratoire de Mycologie Apliquée du Département de Technologie des Aliments de l'Université de Lleida pour son aide précieuse et sa gentillesse.*

# Liste des tableaux

## Première partie : Synthèse bibliographique

### II- Les mycotoxines

**Tableau 1 :** Occurrence des mycotoxines dans les céréales à travers le monde.....27

**Tableau 2 :** Teneurs maximales en mycotoxines dans divers aliments destinés à l'Homme (European Commission, 2002 ; 2006b ; 2007 ; 2010) et l'animal (The European Parliament and Council, 2002 ; European Commission, 2006a).....30

**Tableau 3:** Teneurs maximales en mycotoxines dans divers aliments destinés à l'Homme dans quelques pays de l'Afrique du Nord (INNORPI, 1983 ; FAO, 2004 ; Zineddine et al., 2006).....32

### Deuxième partie : Données expérimentales

#### Chapitre I : Inventaire et caractérisation de la mycobiota (flore fongique) du sorgho commercialisé en Tunisie

**Tableau 4 :** Couples d'amorces utilisés dans l'identification des espèces fongiques.....63

**Tableau 5 :** Valeurs moyennes de dénombrement total des champignons ainsi que les principaux genres dans les échantillons de sorgho exprimées en CFU/g.....66

**Tableau 6 :** Composition de la mycobiota (flore fongique) du sorgho prélevé des marchés tunisiens durant les années 2011 et 2012 (valeurs moyennes + erreurs).....67

**Tableau 7 :** Caractérisation des espèces appartenant à *Aspergillus* sections *flavi* et *nigri* par les outils moléculaires.....72

**Tableau 8 :** Capacité de production de mycotoxines par des isolats appartenant aux genres *Aspergillus* et *Fusarium* testés sur CYA.....76

#### Chapitre II : Incidence de l'Aflatoxine B1, de l'Ochratoxine A et de la Zéaralénone dans le sorgho

**Tableau 9 :** Valeurs des concentrations (mM), du pouvoir absorbant A (D.O) et du coefficient d'extinction molaires ( $\epsilon$ ) des trois solutions A, B et C déterminées avec un spectrophotomètre à 350 nm contre un blanc de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.....82

**Tableau 10 :** Valeurs des coefficients d'extinction molaire ( $\epsilon$ ), des poids moléculaires, des concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) et des longueurs d'ondes d'absorbance sous U.V (nm) de l'AFB1, l'OTA et la ZEN.....83

**Tableau 11 :** Valeurs de LOD et LOQ pour l'AFB1, l'OTA et la ZEN.....88

<b>Tableau 12</b> : Valeurs des pourcentages de recouvrement (Rc), des déviations standard et des coefficients de variation des méthodes d'analyse de l'AFB1, l'OTA et la ZEN.....	89
<b>Tableau 13</b> : Incidence de l'AFB1, l'OTA et la ZEN dans les échantillons de sorgho.....	90
<b>Tableau 14</b> : Co-occurrence de l'AFB1, l'OTA et la ZEN dans les échantillons de sorgho.....	92
<b>Chapitre III : Profils écophysologiques des espèces <i>Aspergillus flavus</i>, <i>Aspergillus tubingensis</i> et <i>Fusarium incarnatum</i> : influence des facteurs abiotiques sur la croissance et l'accumulation des mycotoxines dans les grains de sorgho</b>	
<b>Tableau 15</b> : Analyse de variance de l'effet de la température, de l'activité de l'eau et de leurs interactions sur la croissance radiale de 3 isolats d' <i>Aspergillus flavus</i> cultivés dans les grains de sorgho.....	102
<b>Tableau 16</b> : Analyse de variance de l'effet de la température, de l'activité de l'eau et de leurs interactions sur la vitesse de croissance de 3 isolats d' <i>Aspergillus flavus</i> cultivés dans les grains de sorgho.....	102
<b>Tableau 17</b> : Les valeurs des coefficients R <sup>2</sup> (%) et des erreurs obtenues par développement du modèle du Baranyi pour trois <i>Aspergillus flavus</i> cultivés sur les grains de sorgho pour chaque condition testée.....	104
<b>Tableau 18</b> : Concentration de l'AFB1 (moyenne + erreur) produite dans les grains de sorgho par trois <i>Aspergillus flavus</i> à 0,91, 0,94, 0,97 et 0,99 a <sub>w</sub> et à différentes températures après 7, 14, 21 et 28 jours.....	108
<b>Tableau 19</b> : Analyse de variance de l'effet de l'activité de l'eau et de la température sur la production de l'AFB1 par 3 isolats d' <i>Aspergillus flavus</i> après 7 et 14 jours d'incubation dans les grains de sorgho.....	109
<b>Tableau 20</b> : Analyse de variance de l'effet de l'activité de l'eau et de la température sur la production de l'AFB1 par 3 isolats d' <i>Aspergillus flavus</i> après 21 et 28 jours d'incubation dans les grains de sorgho.....	110
<b>Tableau 21</b> : Analyse de variance de l'effet de la température, de l'activité de l'eau et de leurs interactions sur la croissance radiale de 3 isolats d' <i>Aspergillus tubingensis</i> cultivés dans les grains de sorgho.....	113
<b>Tableau 22</b> : Analyse de variance de l'effet de la température, de l'activité de l'eau et de leurs interactions sur la vitesse de croissance de 3 isolats d' <i>Aspergillus tubingensis</i> cultivés dans les grains de sorgho.....	113

<b>Tableau 23 :</b> Les valeurs des coefficients $R^2$ (%) et des erreurs obtenues par développement du modèle du Baranyi pour trois <i>Aspergillus tubingensis</i> cultivés sur les grains de sorgho pour chaque condition testée.....	117
<b>Tableau 24 :</b> Concentration de l'OTA (moyenne + erreur) produite dans les grains de sorgho par trois <i>Aspergillus tubingensis</i> à différentes températures et activités d'eau après 7, 14, 21 et 28 jours.....	120
<b>Tableau 25 :</b> Analyse de variance de l'effet de l'activité de l'eau et de la température sur la production de l'OTA par 3 isolats d' <i>Aspergillus tubingensis</i> après 7 et 14 jours d'incubation dans les grains de sorgho.....	123
<b>Tableau 26 :</b> Analyse de variance de l'effet de l'activité de l'eau et de la température sur la production de l'OTA par 3 isolats d' <i>Aspergillus tubingensis</i> après 14 et 21 jours d'incubation dans les grains de sorgho.....	123
<b>Tableau 27 :</b> Analyse de variance de l'effet de l'activité de l'eau et de la température sur la production de l'OTA par 3 isolats d' <i>Aspergillus tubingensis</i> après 21 et 28 jours d'incubation dans les grains de sorgho.....	124
<b>Tableau 28 :</b> Analyse de variance de l'effet des facteurs simples : température, $a_w$ , isolat et leurs interactions sur le taux de croissance de trois isolats de <i>Fusarium incarnatum</i> dans les grains de sorgho.....	125
<b>Tableau 29 :</b> Valeurs des taux de croissance et des coefficients $R^2$ des trois isolats de <i>Fusarium incarnatum</i> incubés à 15, 25 et 37 °C et à 0,91, 0,94, 0,97 et 0,99 $a_w$ .....	126
<b>Tableau 30 :</b> Analyse de variance de l'effet des facteurs simples : température, $a_w$ , isolat, temps d'incubation ainsi que leurs interactions sur la production de ZEN par trois isolats de <i>Fusarium incarnatum</i> cultivés sur des grains de sorgho après 21 et 28 jours d'incubation.....	130
<b>Tableau 31 :</b> Concentration de la ZEN (moyenne + erreur) produite dans les grains de sorgho par trois isolats de <i>Fusarium incarnatum</i> à différentes températures et activités d'eau après 7, 14, 21 et 28 jours.....	131

# Liste des figures

## Première partie : Synthèse bibliographique

### I- Les moisissures

**Figure 1** : Aspect microscopique des *Aspergillus* (tête bisériée).....11

**Figure 2** : Aspect microscopique des *Penicillium*.....13

**Figure 3** : Aspect microscopiques des conidies des *Fusarium*.....15

### II- Les mycotoxines

**Figure 4** : Structure des principales aflatoxines : B1, B2, G1, G2 et M1.....22

**Figure 5** : Structures de l'ochratoxine A, la zéaralénone, le déoxynivalénol et la citrinine...23

**Figure 6** : Structure des fumonisines B1, B2 et B3.....25

**Figure 7** : Voies de biosynthèse des mycotoxines.....29

### III- Conditions de contamination des aliments par les moisissures

**Figure 8** : Profils schématiques des limites croissance/pas de croissance pour les genres *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium*.....35

**Figure 9** : Diagramme montrant l'influence combinée de l'activité d'eau et du pH sur la croissance microbienne.....37

## Deuxième partie : Données expérimentales

### Chapitre I : Inventaire et caractérisation de la mycobiota (flore fongique) du sorgho commercialisé en Tunisie

**Figure 10** : Observation microscopique de quelques moisissures : a) *Aspergillus* section *Nigri*, b) *Curvularia* spp., c) *Drechslera* spp., d) *Chaetomium* spp., e) *Aspergillus* section *Flavi*, f) *Rhizopus* spp., g) *Aspergillus fumigatus*.....69

**Figure 11** : Exemple de gels d'agarose après électrophorèse : 1) bandes d'ADN correspondant au gène de  $\beta$ -tubuline utilisé pour le séquençage pour l'identification des *Fusarium* spp. 2) identification d'*Aspergillus flavus* (F) et *A. parasiticus* (P). 3) identification des espèces d'*Aspergillus* section *Nigri*, bandes correspondant à *A. tubingensis* (T) et *A. niger* (N).....71

**Figure 12** : Arbre phylogénétique montrant les relations évolutives déduites en utilisant la méthode UPGMA.....74

**Figure 13** : Observation macroscopique de quelques moisissures a) culture de 7 jours d'*Aspergillus* section *Flavi* sur CYA. b) colonie d'*Aspergillus flavus* âgée de 7 jours sur

CAM. c) et d) culture de 7 jours d'*Aspergillus oryzae* sur CYA (avant et arrière). e) culture de 7 jours d'*Aspergillus flocculosus*. f) colonies d'*Aspergillus* section *Circumdati*.....77

**Figure 14 :** Observation macroscopique de quelques moisissures a) culture de 7 jours d'*Aspergillus* section *Nigri* sur CYA. b) colonie de 7 jours de *Fusarium incarnatum-equiseti* sur CYA. c) colonie de 7 jours de *Fusarium verticillioides* sur CYA. d) culture d'*Eurotium* spp. sur CYA. e) culture de *Penicillium* spp. sur CYA.....78

**Chapitre II : Incidence de l'Aflatoxine B1, de l'Ochratoxine A et de la Zéaralénone dans le sorgho**

**Figure 15 :** Exemple d'un chromatogramme d'un échantillon contaminé par de l'OTA.....89

**Chapitre III : Profils écophysiologicals des espèces *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tubingensis* et *Fusarium incarnatum* : influence des facteurs abiotiques sur la croissance et l'accumulation des mycotoxines dans les grains de sorgho**

**Figure 16 :** Représentation de l'ajustement par le modèle de Baranyi de 3 répétitions des diamètres des colonies de 3 *A. flavus* cultivés sur les grains de sorgho en fonction du temps à 37 et 25°C et à 0,99 et 0,97 a<sub>w</sub>.....100

**Figure 17 :** Effet de la température et de l'activité de l'eau sur le taux de croissance (mm/jour) et la phase de latence des trois isolats d'*Aspergillus flavus* cultivés sur les grains de sorgho à 37°C, 25°C et 15 °C .....101

**Figure 18 :** Représentation de l'ajustement par le modèle de Baranyi de 3 répétitions des diamètres des colonies de 3 *A. tubingensis* cultivés sur les grains de sorgho en fonction du temps à 37, 25 et 15 °C et à 0,99 et 0,97 a<sub>w</sub>.....115

**Figure 19 :** Effet de la température et de l'activité de l'eau sur le taux de croissance (mm/jour) et la phase de latence des trois isolats d'*Aspergillus tubingensis* cultivés sur les grains de sorgho à 37, 25 et 15 °C.....116

**Figure 20 :** Effet de la température et de l'activité de l'eau sur le taux de croissance (mm/jour) des trois isolats de *Fusarium incarnatum* cultivés sur les grains de sorgho à 37, 25 et 15 °C .....128

## Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

AFB1 : aflatoxine B1

AFM1 : aflatoxine M1

AFs : aflatoxines totales

AOAC : Association of Official Analytical Chemistry

$a_w$  : activité de l'eau

Bt : *Bacillus thuringiensis* dont on a extrait le gène codant à la toxine Cry1Ab

CFU : unité formant colonie (colony forming unity)

CIPCARF: Comité Interministériel Pour le Contrôle des Aliments et la Répression des Fraudes (Maroc)

CIT: citrinine

CYA: Czapeck Yeast Extract Agar

DON : déoxynivalenol

DRBC: Dichloran Rose Bengal Cloramphénicol

EC: European Commission

EFSA : European Food Safety Authority

EU : European Union (Union Européenne)

FAO : Food and Agriculture Organisation

FB1 : fumonisine B1

FHB: Fusarium Head Blight (Fusariose de blé)

HACCP : Hazard Analysis Critical Control Points

HPLC : chromatographie liquide haute performance (High pressure liquid chromatography)

IARC : International Agency for Research on Cancer

INNORPI: Institut National de la Normalisation et de la Propriété Industrielle

ITS: Internal Transcribed Spacer

JECFA : Joint Expert Committee of Food and Additives

LOD : limite de détection (limit of detection)

LOQ : limite de quantification (limit of quantification)

MEA : Malt Extract Agar

NG : pas de croissance (No Growth)

ng : nanogramme

OTA : ochratoxine A

PAT: patuline

PCR: réaction de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction)

PDA: Potato Dextrose Agar

PKS : polykétide synthase

ppm :partie par million

QTL : Quantitative trait loci (locus de caractères quantitatifs)

SCF : European Commission Scientific Committee on Food (Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine)

TFA : acide trifluoroacétique

T° : température

ZEN : zéaralénone

µg :microgramme

## Publications et communications

### Publications

- 1- Toxigenic molds in Tunisian and Egyptian sorghum for human consumption. Amani Lahouar, Ana Crespo-Sempere, Sonia Marín, Salem Saïd, Vicente Sanchis. *Journal of Stored Products Research*. 2015, 63: 57-62.
- 2- Effects of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and aflatoxin B1 production by toxinogenic *Aspergillus flavus* isolates on sorghum seed. Amani Lahouar, Sonia Marin, Ana Crespo-Sempere, Salem Saïd, Vicente Sanchis. *Revista Argentina de Microbiologia* 2016, 48 (1): 78-85

### Communications et posters

- 1- Participation au congrès international « Plant Protection for the Quality and Safety on the Mediterranean Diet » (Bari, Italie 24-26 octobre 2012). Titre du poster: Temperature, water activity and incubation time effects on aflatoxin B1 production by *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from sorghum. Lahouar Amani, Marin Sonia, Said Salem and Sanchis Vicente.
- 2- Participation aux 4èmes journées scientifiques de l'association Tunisienne de Toxicologie (ATT) et les 1ères journées de la Fédération Maghrébine de Toxicologie (FMT) (Monastir 17-19 mars 2013). Titre de la communication orale : Influence des facteurs écologiques : température et activité de l'eau sur la croissance et la production de l'Aflatoxine B1 de trois isolats d'*Aspergillus flavus* incubés dans des grains de sorgho Lahouar Amani, Jedidi Ines, Marin Sonia, Khaled El Hani, Said Salem, Sanchis Vicente.
- 3- Participation au 24<sup>ème</sup> congrès international de l'ATSB (Association Tunisienne des Sciences Biologiques), (Sousse 25-28 mars 2013). Titre du poster : Influence des facteurs écologiques : température et activité de l'eau sur la croissance et la production de Zéaralénone de trois souches de *Fusarium incarnatum* incubés dans des grains de sorgho. Lahouar Amani, Marin Sonia, Khaled El Hani, Said Salem, Sanchis Vicente.
- 4- Participation au 27<sup>ème</sup> congrès international de l'ATSB (Association Tunisienne des Sciences Biologiques), (Yasmine Hammamet 28-31 Mars 2016). Titre de la communication : Mycologie prédictive : modélisation des effets individuels et combinés de l'activité de l'eau et de la température sur la croissance mycélienne d'*Aspergillus tubingensis* et la production d'ochratoxine A. Lahouar Amani, Jedidi Ines, Marin Sonia, Sempere C. Ana, Saïd Salem, Sanchis Vicente.

# Sommaire

Résumé

Resumen

Abstract

Introduction générale.....1

## Première partie : Synthèse bibliographique

I- Les moisissures.....4

1- Taxonomie et classification.....5

2- Culture et identification.....5

2.1- Examen macroscopique des cultures.....5

2.2- Examen microscopique des cultures.....6

3- Identification des moisissures par les outils moléculaires.....7

4- Champignons mycotoxinogènes.....9

4.1- Le genre *Aspergillus*.....9

4.2- Le genre *Penicillium*.....12

4.3- Le genre *Fusarium*.....14

5- Composition de la flore fongique des céréales et leurs dérivées.....17

II- Les mycotoxines.....19

1- Introduction.....19

2- Historique.....20

3- Les principales mycotoxines.....21

3.1- Aflatoxines.....21

3.2- Ochratoxine A.....22

3.3- Zéaraléonone.....23

3.4- Trichothécènes.....24

3.5- Citrinine.....24

3.6- Fumonisines.....25

4- Contamination des céréales et leurs dérivés par les mycotoxines.....26

5- Biosynthèse des mycotoxines.....28

<b>6- Régulation et législation des mycotoxines dans le monde.....</b>	<b>29</b>
<b>III- Conditions de contamination des aliments par les moisissures.....</b>	<b>33</b>
<b>1- Conditions de la croissance fongique.....</b>	<b>33</b>
<b>1.1- Facteurs physiques affectant la croissance fongique.....</b>	<b>33</b>
<b>1.2- Facteurs chimiques affectant la croissance fongique.....</b>	<b>36</b>
<b>1.3- Facteurs biologiques affectant la croissance fongique.....</b>	<b>38</b>
<b>2- La mycotoxinogénèse.....</b>	<b>38</b>
<b>2.1- Facteurs intrinsèques de la mycotoxinogénèse.....</b>	<b>39</b>
<b>2.2- Facteurs extrinsèques de la mycotoxinogénèse.....</b>	<b>39</b>
<b>IV- Procédés de prévention, de minimisation et de prédiction de la contamination par les mycotoxines.....</b>	<b>44</b>
<b>1- Procédés de prévention et de minimisation des mycotoxines au cours et après la récolte .....</b>	<b>44</b>
<b>1.1- Stade physiologique des plantes.....</b>	<b>44</b>
<b>1.2- Contrôle du niveau d'humidité avant et pendant le stockage.....</b>	<b>44</b>
<b>1.3- Contrôle de la température pendant le stockage.....</b>	<b>45</b>
<b>1.4- Traitements physiques des grains contaminés.....</b>	<b>45</b>
<b>1.5- Traitements chimiques.....</b>	<b>47</b>
<b>1.6- Usage des adsorbants.....</b>	<b>47</b>
<b>1.7- Traitements biologiques.....</b>	<b>48</b>
<b>2- Etablissement d'un plan HACCP.....</b>	<b>51</b>
<b>3- Modèles de prédiction.....</b>	<b>52</b>
<b>3.1- Modèles cinétiques appliqués à la germination, à la croissance et à l'inactivation des moisissures.....</b>	<b>54</b>
<b>3.2- Modèles cinétiques appliqués à la production des mycotoxines.....</b>	<b>56</b>
<b>Objectifs du travail.....</b>	<b>58</b>
<b>Deuxième partie : Données expérimentales</b>	
<b>Chapitre I : Inventaire et caractérisation de la mycobiota (flore fongique) du sorgho commercialisé en Tunisie.....</b>	<b>59</b>

<b>1- Introduction.....</b>	<b>59</b>
<b>1- Matériel et méthodes.....</b>	<b>59</b>
<b>2.1- Echantillons utilisés.....</b>	<b>59</b>
<b>2.2- Détermination de la mycobiota (flore fongique).....</b>	<b>60</b>
<b>2.2.1- Enumération.....</b>	<b>60</b>
<b>2.2.2- Identification de la mycobiota (flore) interne du sorgho.....</b>	<b>61</b>
<b>2.2.3- Confirmation de l'identité des espèces fongiques par les outils moléculaires.....</b>	<b>61</b>
<b>2.2.3.1- Extraction d'ADN.....</b>	<b>61</b>
<b>2.2.3.2- Déroulement de la PCR.....</b>	<b>62</b>
<b>2.2.3.3- Identification des produits de PCR.....</b>	<b>64</b>
<b>2.3-Capacité de production de mycotoxines.....</b>	<b>64</b>
<b>3- Résultats et discussion.....</b>	<b>66</b>
<b>3.1- Détermination de la mycobiota (flore fongique).....</b>	<b>66</b>
<b>3.1.1- Enumération.....</b>	<b>66</b>
<b>3.1.2- Détermination de la mycobiota interne du sorgho.....</b>	<b>66</b>
<b>3.1.3- Confirmation de l'identité de quelques isolats par des outils moléculaires.....</b>	<b>70</b>
<b>3.2- Capacité de production de mycotoxines.....</b>	<b>75</b>
<b>4- Conclusion.....</b>	<b>79</b>

**Chapitre II : Incidence de l'Aflatoxine B1, de l'Ochratoxine A et de la Zéaralénone dans le sorgho.....80**

<b>1- Introduction.....</b>	<b>80</b>
<b>2- Matériel et méthodes.....</b>	<b>80</b>
<b>2.1- Echantillons.....</b>	<b>80</b>
<b>2.2- Réactifs.....</b>	<b>80</b>
<b>2.3- Equipement.....</b>	<b>81</b>
<b>2.4- Préparation des solutions standards.....</b>	<b>81</b>
<b>2.4.1- Contrôle du spectrophotomètre.....</b>	<b>81</b>
<b>2.4.2- Préparation des solutions standards.....</b>	<b>82</b>
<b>2.5- Confirmation de présence de l'OTA.....</b>	<b>83</b>
<b>2.6- Confirmation de la présence de l'AFB1.....</b>	<b>84</b>
<b>2.7- Méthode d'analyse simultanée de l'AFB1 et de l'OTA.....</b>	<b>84</b>
<b>2.7.1- Extraction et purification.....</b>	<b>84</b>
<b>2.7.2- Les conditions de HPLC.....</b>	<b>85</b>

2.8- Méthode d'analyse de la ZEN.....	85
2.8.1- Extraction et purification.....	85
2.8.2- Les conditions de HPLC.....	86
2.9- Méthode de validation.....	86
2.10- Analyse statistique.....	88
3- Résultats et discussion.....	88
3.1- Validation des méthodes d'analyses.....	88
3.2- Incidence de l'AFB, l'OTA et la ZEN.....	90
3.3- Co-occurrence des mycotoxines.....	92
4- Conclusion.....	93

**Chapitre III : Profils écophysologiques des espèces *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tubingensis* et *Fusarium incarnatum* : influence des facteurs abiotiques sur la croissance et l'accumulation des mycotoxines dans les grains de sorgho.....**

1- Introduction.....	94
2- Matériel et méthodes.....	96
2.1- Souches utilisées.....	96
2.2- Conception expérimentale et analyse statistique.....	97
2.3- Préparation du sorgho.....	97
2.4- Préparation de l'inocula et incubation.....	97
2.5- Mesure des diamètres des colonies et calcul de la vitesse de croissance.....	98
2.6- Quantification de l'accumulation des mycotoxines.....	99
3- Résultats et discussion.....	99
3.1- Profil écophysologique de l'espèce <i>Aspergillus flavus</i> .....	99
3.1.1- Influence de l'activité de l'eau et de la température sur la croissance mycélienne.....	99
3.1.2- Influence de l'activité de l'eau et de la température sur l'accumulation de l'AFB1.....	107
3.2- Profil écophysologique de l'espèce <i>Aspergillus tubingensis</i> .....	113
3.2.1- Influence de l'activité de l'eau et de la température sur la croissance mycélienne.....	113
3.2.2- Influence de l'activité de l'eau et de la température sur l'accumulation de l'OTA.....	119
3.3- Profil écophysologique de l'espèce <i>Fusarium incarnatum</i> .....	125

<b>3.3.1- Influence de l'activité de l'eau et de la température sur la croissance mycélienne.....</b>	<b>125</b>
<b>3.3.2- Influence de l'activité de l'eau et de la température sur l'accumulation de la ZEN.....</b>	<b>129</b>
<b>4- Conclusion.....</b>	<b>134</b>
<b>Conclusion générale et perspectives. ....</b>	<b>135</b>

## Résumé

Au cours de ce travail, nous avons étudié la contamination de 64 échantillons de sorgho, prélevés de plusieurs points de vente de la région du Sahel Tunisien, par l'aflatoxine B1, l'ochratoxine A et la zéaralénone. L'extraction des mycotoxines a été effectuée par des solvants organiques et leur détermination a été réalisée par HPLC. Les résultats ont montré que 59,37%, 37,5% et 32,81% des échantillons sont contaminés respectivement par l'aflatoxine B1, l'ochratoxine A et la zéaralénone. La co-contamination par les trois mycotoxines a été détectée dans 12,5% de la totalité des échantillons. L'identification de la mycobiota (flore fongique) des mêmes échantillons de sorgho est effectuée en trois parties : énumération quantitative du nombre de champignons contenu dans chaque échantillon, détermination de la flore interne du sorgho par observation au microscope des colonies de moisissures et enfin confirmation de l'identité des moisissures par biologie moléculaire. La capacité des isolats de produire l'une des trois mycotoxines étudiées a été réalisée par extraction de la colonie avec du méthanol et détermination par HPLC. Les résultats ont montré la prédominance des genres *Fusarium*, *Aspergillus* et *Alternaria*. *Aspergillus flavus* est l'espèce la plus courante parmi la section *Flavi* dans les grains de sorgho, alors qu'*Aspergillus niger* aggregates sont les plus dominants de la section *Nigri*. Parmi les espèces appartenant au genre *Fusarium*, *Fusarium* section *Liseola* et le complexe *Fusarium incarnatum-equiseti* sont les plus dominants dans le sorgho. L'évaluation de la capacité de production des mycotoxines des champignons a montré que 40,24% d'*Aspergillus flavus*, 4,61% d'*Aspergillus* section *Nigri* et 11,09% des isolats appartenant au genre *Fusarium* sont producteurs de l'aflatoxine B1, l'ochratoxine A et la zéaralénone, respectivement.

Afin d'établir des approches visant la prévention et la minimisation de la contamination des grains de sorgho par les mycotoxines, les profils écophysio-logiques des espèces *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tubingensis* et *Fusarium incarnatum* ont été étudiés. Des études de l'influence de la température, la disponibilité de l'eau et le temps d'incubation sur la croissance mycélienne et la production des mycotoxines ont été effectuées. Les résultats ont révélé que : *Aspergillus flavus* prolifère et produit plus d'aflatoxine B1 à 37°C et 0,99 a<sub>w</sub>, la croissance optimale d'*Aspergillus tubingensis* a lieu à 0,99 a<sub>w</sub> et 37°C alors que la production maximale de l'ochratoxine A se situe à 0,97 a<sub>w</sub> et 25°C. *Fusarium incarnatum* prolifère plus à 25°C et 0,99 a<sub>w</sub> et les conditions optimales à la production de la zéaralénone ne sont pas bien définies. Nous n'avons pas trouvé des publications sur le profil écophysio-logique de l'espèce *Fusarium incarnatum*.

Notre étude est une approche qui vise à comprendre la physiologie des espèces fongiques productrices de mycotoxines vis-à-vis du climat tunisien afin de fixer des niveaux limites à ne pas dépasser permettant de contrôler leur prolifération dans les céréales.

**Mots-clés :** Mycotoxines, flore fongique, incidence, sorgho, profil écophysiological, activité de l'eau, température, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Flavi*, *Nigri*.

## Resumen

Durante esta tesis se estudió la contaminación de 64 muestras de sorgo recogidas de varios puntos de venta en la región de Sahel tunecino por aflatoxina B1, ocratoxina A y zearalenona. La extracción de las micotoxinas en las muestras se realizó con disolventes orgánicos y la determinación se realizó con HPLC. Los resultados mostraron que 59,37%, 37,5% y 32,81% de las muestras estaban contaminadas por aflatoxina B1, ocratoxina A y zearalenona, respectivamente. La co-contaminación por las tres micotoxinas se detectó en el 12,5% de todas las muestras. La identificación de la microbiota presente en estas mismas muestras de sorgo se realizó en tres fases: a) Recuento cuantitativo medios de cultivo del número de hongos contenidos en cada muestra; b) Determinación/identificación de la microbiota interna de sorgo mediante observación macroscópica y microscópica de colonias de mohos comparando con guías de clasificación y finalmente, c) Confirmación de la identidad de los mohos por técnicas de biología molecular. La capacidad de producir micotoxinas de las cepas aisladas se realizó por extracción de la colonia fúngica con metanol y determinación por HPLC.

Los resultados obtenidos en las muestras de sorgo estudiadas mostraron el predominio de los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* y *Alternaria*. Entre las especies del género *Fusarium*, destacaron las pertenecientes a la sección *Liseola* y al complejo *Fusarium incarnatum-equiseti*. Con respecto al género *Aspergillus*, *A. flavus* fue la especie más común en la sección *Flavi*, mientras que las especies del agregado de *Aspergillus niger* fueron los más dominantes en la sección *Nigri*, destacando el *Aspergillus tubingensis*. La evaluación de la capacidad de producción de micotoxinas de las cepas fúngicas aisladas de las muestras estudiadas mostró que 40,24% de los aislados de *Aspergillus flavus*, 4,61% de los aislados de *Aspergillus* sección *Nigri* y 11,09% de los aislados pertenecientes al género *Fusarium* fueron productores de aflatoxina B1, ocratoxina A y zearalenona, respectivamente. *Alternaria tenuis* destacó también por su alta incidencia en las muestras investigadas.

Se estudiaron los perfiles ecofisiológicos de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tubingensis* y *Fusarium incarnatum* con el fin de buscar métodos para la prevención y la minimización de la contaminación del sorgo por micotoxinas. Para ello se realizaron estudios sobre la influencia de la temperatura, la actividad de agua ( $a_w$ ) y el tiempo de incubación sobre el crecimiento y la producción de micotoxinas en muestras de sorgo. Los resultados mostraron que *Aspergillus flavus* proliferó y produjo más aflatoxina B1 a 37 °C y a una  $a_w$  de 0,99. El crecimiento óptimo de *Aspergillus tubingensis* tuvo lugar a 0,99  $a_w$  y 37 °C, mientras

que la producción máxima de ocratoxina A se produjo a 0,97  $a_w$  y 25 °C. Con respecto a *Fusarium incarnatum* el crecimiento mayor se observó a 25 °C y 0,99  $a_w$ , pero no se pudo determinar las condiciones óptimas para la producción de la zearalenona.

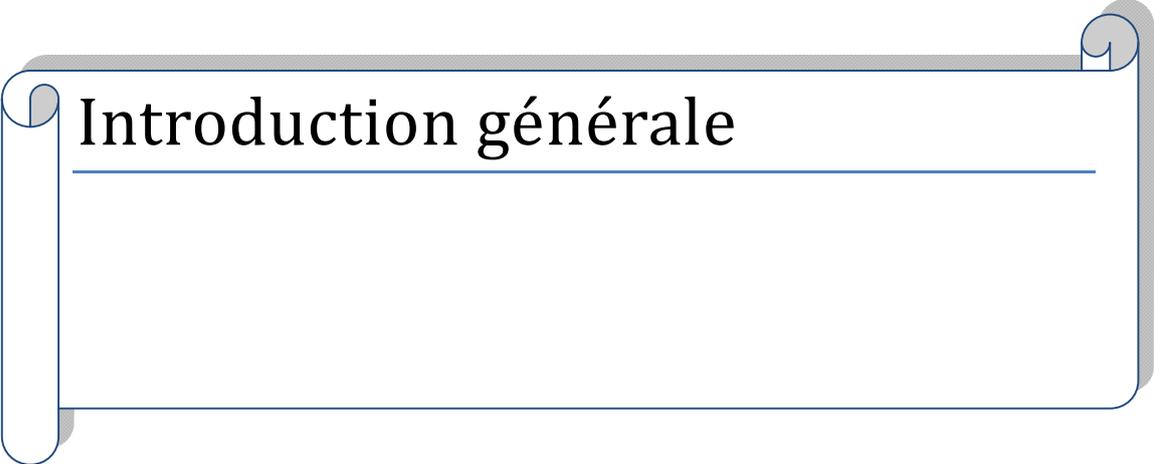
El presente trabajo pretende estudiar la ecofisiología de tres de las principales especies fúngicas en las muestras con el fin de prevenir y controlar su crecimiento en sorgo y evitar la bioacumulación de aflatoxina B1, ocratoxina A y zearalenona en este cereal de gran importancia para la alimentación humana y animal en Túnez.

**Palabras clave:** micotoxinas, microbiota, incidencia, sorgo, perfil ecofisiológico, actividad de agua, temperatura, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Flavi*, *Nigri*.

## Abstract

In this thesis, we have studied the occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenon in 64 sorghum samples purchased from Tunisian market. Mycotoxins extraction was carried with organic solvents and their determination was achieved by HPLC. The results showed that 59.37%, 37.5% and 32.81% of samples were contaminated with aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenone, respectively. The co-occurrence of these three mycotoxins was observed in 12.5% of total samples. The mycobiota of sorghum samples was determined in three times. The first step was the quantitative fungal count using “Direct Plating” method, later the internal mycobiota was determined by microscopic observation of colonies mold and finally, fungal identity was confirmed by molecular characterization. The mycotoxin-producing ability was verified by extraction of the mold colonies with methanol and detection by HPLC. The results showed the predominance of the genera *Fusarium*, *Aspergillus* and *Alternaria*. *Aspergillus flavus* was the most common species in sorghum grain among the section *Flavi*, while *Aspergillus niger* aggregates were the most dominant in the section *Nigri*. Among *Fusarium* species, *Fusarium* section *Liseola* and the *Fusarium incarnatum-equiseti* complex were the most dominant in sorghum. The study of the mycotoxin-producing ability showed that 40.24% of *Aspergillus flavus*, 4.61% of *Aspergillus* section *Nigri* and 11.09% of *Fusarium* isolates produce aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenon, respectively. To develop mycotoxin minimization and prevention procedures, ecophysiological profiles of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tubingensis* and *Fusarium incarnatum* were studied. The effects of water activity, temperature and incubation time on mycelia growth and mycotoxin production were studied. According to our results, *Aspergillus flavus* grew and produced more aflatoxin B1 at 37 °C and 0.99 a<sub>w</sub>. Optimal conditions for *Aspergillus tubingensis* were 0.99 a<sub>w</sub> and 37 °C, but maximum production of ochratoxin A occurred at 0.97 a<sub>w</sub> and 25 °C, while *Fusarium incarnatum* grew more at 25 °C and 0.99 a<sub>w</sub> but optimal conditions for zearalenone accumulation cannot be determined. However, we did not find publications on ecophysiological profile of *Fusarium incarnatum* species. This study is an approach that seeks to understand the physiology of fungal species producing mycotoxins under different climatic conditions in order to set limits for the control fungal spoilage and mycotoxin accumulation in cereals.

**Keywords:** Mycotoxins, mycobiota, incidence, sorghum, ecophysiological profile, water activity, temperature, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Flavi*, *Nigri*.



# Introduction générale

---

## *Introduction générale*

### **Introduction générale**

L'Homme se nourrit d'aliments d'origine animale ou végétale, crus ou cuits qu'il trouve dans son environnement et pris directement de la nature ou transformés par l'industrie alimentaire. Tous ces aliments risquent de devenir de véritables vecteurs de maladies lorsqu'ils renferment des substances chimiques toxiques (métaux lourds, toxines de bactéries ou de champignons, hydrocarbures aliphatiques, pesticides...) ou des agents pathogènes biologiques (virus, bactéries, champignons). Ces états pathologiques sont presque toujours en rapport avec des contaminations diverses qui relèvent d'un manque d'hygiène, d'erreurs grossières de préparation ou de conservation des aliments et l'absence de la maîtrise des bonnes pratiques d'agriculture, de fabrication, de stockage et de distribution. Les répercussions sur la santé humaine et l'économie qui résultent de la dégradation de la qualité nutritionnelle et hygiénique des produits alimentaires sont énormes à l'échelle mondiale. Vue le progrès industriel, économique et social que le monde a connu durant les deux derniers siècles et l'accroissement remarquable de la production et de la circulation des aliments afin de satisfaire les besoins nutritionnels de la population mondiale, la prévention de la contamination des denrées alimentaires par tout agent pathogène devient de plus en plus une nécessité de premier ordre.

Parmi les agents pathogènes qui peuvent contaminer les aliments, les champignons mycotoxinogènes constituent un danger réel pour la santé de l'Homme et de l'animal lorsqu'elles contaminent les différents produits alimentaires. La prolifération fongique et la contamination par les mycotoxines altèrent la qualité marchande des produits alimentaires impliquant d'énormes pertes économiques (Bhat & Vasanthi, 2003). La FAO (Food and Agriculture Organisation) estime qu'environ 25% des récoltes mondiales sont susceptibles d'être contaminées par les mycotoxines (Yiannikouris & Jouany, 2002). L'impact économique des mycotoxines sur l'industrie alimentaire et l'élevage représente un coût annuel d'environ 5 milliards de dollars aux Etats unis et le Canada. En Europe, une potentielle perte économique estimée entre 800 et 1000 millions d'euros est due à la contamination des céréales par l'ochratoxine A (Olsen et al., 2003). Le nombre de mycotoxines responsables d'effets secondaires sur la santé humaine et animale est en perpétuelle augmentation. En parallèle, les dispositions législatives prises pour contrôler la présence des mycotoxines dans les aliments destinés pour l'être humain et l'animal sont renouvelées au fur et à mesure. Cependant, ces législations ne considèrent que cinq importantes mycotoxines : les aflatoxines

## *Introduction générale*

(AFs), l'ochratoxine A (OTA), la zéaralénone (ZEN), le déoxynivalénol (DON) et les fumonisines qui sont les plus fréquentes et les plus dangereuses (Miller, 1995).

Du fait que les mycotoxines ne peuvent jamais être complètement absentes ou éliminées des denrées alimentaires, et afin de cerner les problèmes engendrés par ces substances, plusieurs pays ont établi des normes fixant les teneurs maximales tolérées des mycotoxines dans un produit alimentaire déterminé et qui ne sont pas susceptibles d'engendrer un problème de santé chez le consommateur. Ainsi, dans le cadre des travaux menés par la Commission Européenne et le *Codex Alimentarius*, des règlements et des recommandations ont été édictés à travers le monde afin de fiabiliser les échanges commerciaux des produits alimentaires.

A côté des réglementations fixant les teneurs maximales des mycotoxines dans les aliments, d'autres mesures et stratégies destinées à limiter et prévenir la contamination dans les denrées sont développées. Il s'agit de limiter d'une part la contamination des produits par les champignons à tous les stades de la chaîne de production et de détecter d'autre part le plus précocement possible les mycotoxines dans les matières premières avant que ces dernières ne soient transformées en produits finaux (Jouany, 2007).

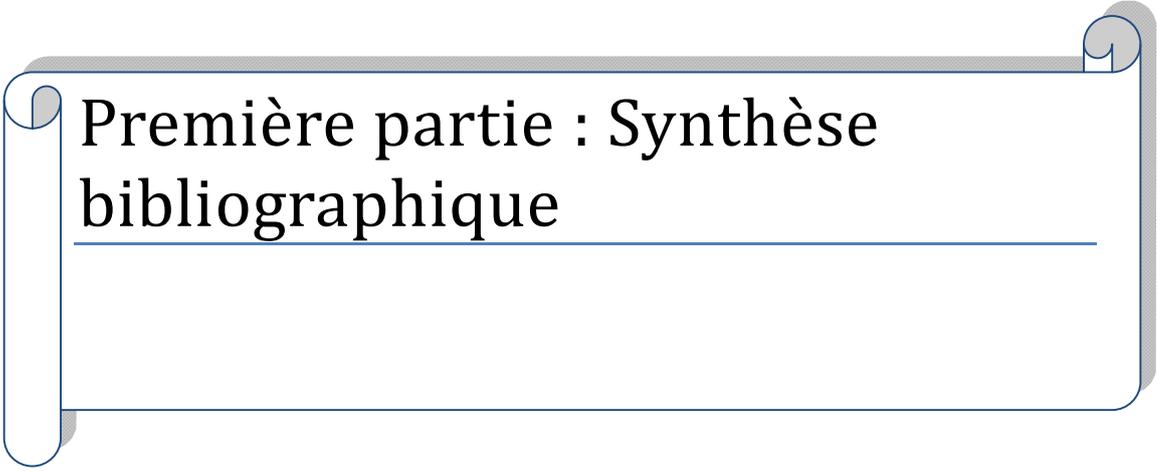
Actuellement, il n'existe pas de procédés de décontamination fiables permettant d'éliminer les mycotoxines sans dénaturer la denrée alimentaire (Jouany, 2007). Une stratégie de prévention est donc exigée. Pour cela, il est indispensable de comprendre la physiologie des champignons toxigènes ainsi que les conditions de sécrétion des mycotoxines.

Le sorgho est une denrée alimentaire très consommée en Tunisie (Oueslati et al., 2014). La première découverte de la contamination des aliments par les aflatoxines en Tunisie a eu lieu dans le sorgho et le pin d'Alep par Boutrif et al. (1977). Depuis 1977, plusieurs études ont confirmé la contamination du sorgho commercialisé en Tunisie par les mycotoxines. En général, le sorgho représente une source majeure d'exposition à l'aflatoxine B1 du fait de sa contamination par des teneurs élevées de cette toxine (Saïd & Feki, 1996 ; Said et al., 1998 ; Ghali et al., 2009a). D'autres mycotoxines peuvent être aussi présentes dans cette céréale comme l'ochratoxine A (Ghali et al., 2008 ; Zaied et al., 2009) et la zéaralénone (Ghali et al., 2008). En effet, l'incidence élevée des mycotoxines dans les céréales tunisiennes avec des teneurs souvent supérieures aux seuils fixés par les législations, les problèmes de santé que peuvent engendrer ces contaminants chimiques, les pertes économiques dues au débarras des produits contaminés, les contraintes qui peuvent être rencontrées par les industriels et le manque d'informations sur la physiologie et le métabolisme des mycotoxines

## *Introduction générale*

des souches fongiques tunisiennes et leur potentielle adaptation aux changements climatiques, nous ont conduit à chercher des méthodes de prévention et de minimisation de la contamination de ce type de denrée par les mycotoxines.

Dans le cadre de cette thèse nous avons étudié l'occurrence de l'aflatoxine B1, l'ochratoxine A et la zéaralénone dans les grains du sorgho commercialisé en Tunisie, la composition de la flore fongique du sorgho, la capacité de production des mycotoxines et l'incidence des souches toxigènes et enfin l'influence de la température et de l'activité d'eau sur la croissance et la production de l'aflatoxine B1, l'ochratoxine A et la zéaralénone dans les grains de sorgho par des espèces appartenant aux genres *Aspergillus* et *Fusarium*.



Première partie : Synthèse  
bibliographique

---

## Synthèse bibliographique

### I- Les moisissures

Les champignons ou les mycètes sont des organismes uni- ou pluri-cellulaires incluant des espèces macroscopiques (macromycètes) et d'autres microscopiques (micromycètes), d'aspect filamenteux ou levuriforme. Les champignons sont ubiquitaires et se trouvent partout dans la nature. Leur rôle essentiel est la biodégradation et le recyclage des matières organiques. Il s'agit de microorganismes hétérotrophes qui nécessitent une source de carbone et d'azote pour leur développement. Dans la classification du monde vivant, les mycètes constituent un règne distinct de celui des végétaux et des animaux (Chabasse et al., 2002). Leur particularité morphologique est d'être étroitement liée à leur substrat nutritif grâce à un réseau mycélien très développée. Leur reproduction est aussi une caractéristique remarquable. En fait, les champignons produisent un très grand nombre de spores, ce qui leur assure un grand pouvoir de diffusion ou de contamination. Ces spores sont issus de deux modalités de reproduction sexuée ou asexuée. Les micromycètes deviennent parfois visibles lorsqu'elles forment de véritables agglomérats de filaments mycéliens et d'organes fructifères. C'est ce qu'on appelle les moisissures (Chabasse et al., 2002).

A l'opposé des macromycètes, les micromycètes représentent les agents habituels de mycoses et peuvent être à l'origine d'infections animales et végétales. Les champignons établissent avec les espèces animales et végétales différents types d'interactions comme le saprobie, le parasitisme, le commensalisme et la symbiose. Le pouvoir pathogène des champignons peut s'exprimer de diverses façons. Ils peuvent infecter le corps humain ou animal provoquant des maladies appelées mycoses. En produisant des toxines, ils peuvent être à l'origine d'intoxication alimentaire ou de mycotoxicoses suite à la consommation des aliments contaminés par l'être humain ou l'animal. Il existe aussi des champignons utiles qui présentent des avantages économiques intéressants pour l'Homme. Elles sont utilisées dans l'industrie pour conférer aux produits des propriétés organoleptiques et technologiques supérieures comme le *Penicillium camemberti* et *Penicillium roqueforti* utilisés dans l'affinage des fromages, *Penicillium jensenii* ou *P. nalgiovense* utilisés en salaisonnerie. D'autres sont exploitées pour la production des enzymes (par exemple la protéase et la pectinase produites par *A. niger*), d'acides organiques (acide citrique et gluconique produits par des espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium*) et d'antibiotiques (pénicilline produite par *P. chrysogenum*) (Kiffer & Morelet, 1997 ; Perry et al., 2004).

## *Synthèse bibliographique*

### **1- Taxonomie et classification**

Le règne des mycètes comprend des divisions, elles même subdivisées en classes. Celles-ci englobent des ordres qui rassemblent des familles. L'identification des champignons est essentiellement morphologique. Un micromycète peut parfois se présenter sous différentes formes : une forme sexuée ou téléomorphe et une forme asexuée ou anamorphe. Lorsque plusieurs aspects coexistent pour la forme asexuée, on parle de synanamorphes. Lorsque l'espèce fongique existe dans la même culture sous forme sexuée et asexuée, on parle d'holomorphe. On différencie quatre divisions selon les modalités de reproduction sexuée : les Mastigomycotina, les Zygomycotina, les Ascomycotina et les Basidiomycotina. En outre, lorsque la reproduction sexuée n'est pas connue, la division est appelée Deuteromycotina ou *Fungi imperfecti* (Chabasse et al., 2002).

### **2- Culture et identification**

L'identification des mycètes repose sur des critères macroscopiques (aspect et couleur des colonies) et microscopiques (observation des filaments végétatifs, des organes de fructification et des spores). Certaines données comme la température et la vitesse de croissance peuvent être des compléments d'identification.

#### **2.1- Examen macroscopique des cultures**

La vitesse de croissance peut être rapide comme chez les *Aspergillus* ou lente comme chez les *Penicillium*. Elle varie aussi selon la richesse de l'inoculum. Elle est d'autant plus rapide que l'inoculum est important. L'aspect des colonies est également un critère d'orientation. Les champignons luviformes donnent des colonies lisses, glabres, humides, d'aspect brillant ou mat, parfois rugueuses. Par contre, les champignons filamenteux ont une texture différente : duveteuse, cotonneuse, veloutée, poudreuse ou granuleuse. La couleur de la colonie est également un élément pertinent d'orientation ainsi que la présence d'un pigment dans la gélose, bien que ces derniers critères sont soumis aux conditions de culture. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*). La taille des colonies peut être très variable en fonction des genres fongiques : petites colonies (*Cladosporium*), ou colonies étendues, envahissantes (*Mucor*, *Rhizopus*) (Chabasse et al., 2002).

## *Synthèse bibliographique*

### **2.2- Examen microscopique des cultures**

L'examen microscopique d'une colonie fongique est réalisé après prélèvement d'un ou plusieurs fragments de la culture et étalement de la préparation entre lame et lamelle. Généralement, l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence les éléments importants du diagnostic (Chabasse et al., 2002).

#### **2.2.1- Le thalle végétatif**

Tous les champignons possèdent un appareil végétatif constitué de filaments (hyphes), l'ensemble est appelé thalle ou mycélium. On distingue :

- Le thalle siphonné ou coenocytique : Il est constitué d'éléments tubulaires peu ou pas ramifiés, de diamètre large et irrégulier et non cloisonnés. Ces filaments caractérisent les champignons inférieurs (Zygomycètes, Chytridiomycètes) (Chabasse et al., 2002).

- Le thalle septé ou cloisonné : Il correspond aux champignons dits « supérieurs » : Ascomycètes, Basidiomycètes et Deutéromycètes filamenteux. Ces filaments ont un diamètre étroit et régulier : leurs bords sont parallèles. Ils sont divisés par des cloisons ou *septa* en articles uni ou pluricellulaires (Chabasse et al., 2002).

#### **2.2.2- L'origine endogène ou exogène des spores**

Il y a deux modes de formation de spores asexuées :

- Spores endogènes : Chez les Mucorales, les endospores sont produites à l'intérieur d'un sac appelé sporocyste (ou sporange) porté par un filament spécialisé. Ainsi les spores asexuées sont libérées par déchirement de la paroi du sporocyste à maturité.

- Spores exogènes : Chez les Basidiomycètes, les Ascomycètes et les Deutéromycètes, les spores asexuées sont formées par bourgeonnement à partir d'une cellule spécialisée appelée cellule conidogène. Les spores ainsi produites sont appelées conidies (Chabasse et al., 2002).

#### **2.2.3- Aspect des spores**

L'examen des spores et leur organisation est une étape primordiale de l'identification des moisissures (Campbell et al., 1996). La forme des spores et leurs modalités éventuelles de septation sont à la base de la classification des Deutéromycètes. Selon leur aspect, on distingue cinq groupes de spores chez les champignons (Chabasse et al., 2002) :

## *Synthèse bibliographique*

- Amérospores : spores unicellulaires de petite taille (exemple : *Penicillium*, *Aspergillus*)
- Didymospores : spores bicellulaires (exemple : *Trichothecium*)
- Phragmospores : spores pluricellulaires à cloisons transversales (exemple : *Drechslera*, *Bipolaris*, *Curvularia*)
- Dictyospores : spores pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales (exemple : *Alternaria*, *Ulocladium*)
- Scolécospores : spores étroites, effilées, souvent incurvées et cloisonnées transversalement (exemple : *Fusarium*).

### **2.2.4- Le mode de groupement des conidies**

Les conidies sont, en général regroupées à l'extrémité de la cellule conidiogène. Le regroupement des conidies représente aussi un critère d'identification (Chabasse et al., 2002).

On distingue :

- En grappes : *Beauveria*, *Trichothecium*
- En masses : *Botrytis*
- En têtes ou « balles » : *Acremonium*, *Trichoderma*
- En chaînes basipètes : *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, *Penicillium*
- En chaîne acropètes : *Cladosporium*, *Alternaria*

### **3- Identification des moisissures par les outils moléculaires**

La méthode traditionnelle de l'identification des moisissures est fondée sur les caractéristiques morphologiques. Cette identification nécessite une culture, parfois sur des milieux spécifiques, pendant 7 jours minimum afin d'obtenir la formation des conidies. L'absence de l'apparition des conidies rendra impossible l'identification du mycélium. D'autre part, la présence d'un très grand nombre d'espèces au sein d'un seul genre rend la distinction très difficile et nécessite un haut degré de spécialisation. En outre, les changements constants dans la taxonomie peuvent conduire à une mauvaise identification et une fausse évaluation de son potentiel toxigène. Par conséquent, de nombreuses études visant à développer des méthodes d'identification basées sur la biologie moléculaire, essentiellement sur l'amplification par PCR (polymerase chain reaction), ont été réalisées. L'identification par PCR est utilisée aussi bien en mycologie médicale qu'en mycologie alimentaire. De nombreux travaux utilisent la biologie moléculaire pour dépister les souches fongiques

## *Synthèse bibliographique*

toxigènes (Niessen, 2007). Les outils de biologie moléculaire sont également utilisés pour prédire le risque potentiel des mycotoxines par la quantification des espèces toxigènes (Niessen, 2007).

Les premières méthodes basées sur la PCR et destinées à l'identification des champignons toxigènes ont été développées pour les espèces productrices d'aflatoxines qui sont les composés les plus toxiques parmi les mycotoxines. Le point de départ du diagnostic des *Aspergillus* section *flavi* par PCR était deux tests de PCR publiés par Geisen (1996) et un autre travail réalisé en parallèle et publié par Shapira et al. (1996). Dans les deux études, les auteurs ont utilisé des séquences des mêmes trois gènes impliqués dans la biosynthèse des aflatoxines chez *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* et *A. versicolor*. Au cours de son travail, Geisen (1996) a fait usage des trois paires d'amorces dans une PCR multiplex dans laquelle il a été démontré que *A. sojae* et *A. oryzae*, morphologiquement identiques à *A. flavus*, ne sont pas producteurs d'aflatoxines à cause de l'absence du gène *nor-1*. L'absence de produits de PCR suite à l'utilisation de ces paires d'amorces a été aussi observé dans le cas des souches d'*A. flavus* non aflatoxinogènes. Mayer et al. (2003) ont utilisé des séquences du gène *nor-1* pour mettre en place des amorces et une sonde pour une analyse TaqMan™-PCR en temps réel avec lequel *A. flavus* a été quantifié dans des échantillons d'aliments contaminés et dans les céréales. Haugland et Vesper (2000) ont décrit un système de détection spécifique d'*A. nomius* basé sur l'amplification des amorces spécifiques de la région ITS du gène de l'ARNr couplé à une sonde fluorescente par une TaqMan™-PCR en temps réel.

Plusieurs méthodes quantitatives de PCR en temps réel ont été développées pour la détection de certains membres d'*Aspergillus* section *Nigri*, principalement pour la détection et la quantification d'*A. carbonarius*. Mulè et al. (2006) ont mis au point un test quantitatif de PCR en temps réel pour la détection d'*A. carbonarius* dans les raisins, basé sur le ciblage du gène de la calmoduline. Pour la détection et la quantification des espèces ochratoxinogènes, les gènes impliqués dans la biosynthèse des mycotoxines sont les meilleurs cibles. A nos jours, il y a peu d'informations sur les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'OTA, mais il est bien connu que la polykétide synthase (PKS) est nécessaire. Parmi les champignons ochratoxinogènes, différents gènes de PKS impliqués dans la biosynthèse de l'OTA ont été identifiés chez *Aspergillus ochraceus* (O'Callaghan et al., 2003), *A. westerdijkiae* (Atoui et al., 2006 ; Bacha et al., 2009), *A. carbonarius* (Atoui et al., 2006; Gallo et al., 2009), *Penicillium nordicum* (Geisen et al., 2004) et *P. verrucosum* (Schmidt-Heydt et al., 2008). Certains de ces gènes ont été utilisés comme une cible pour développer des méthodes précises qui permettent

## *Synthèse bibliographique*

une identification et une quantification rapide, sensible et spécifique des souches productrices d'OTA. Pour la détection des *A. niger* agrégats, Selma et al. (2009) ont mis au point une PCR multiplex en temps réel pour la détection simultanée d'*A. carbonarius* et *A. niger* agrégats par la conception d'une paire d'amorces et d'une sonde spécifique aux espèces appartenant à *A. niger* aggregate à partir d'une région conservée dans le domaine de l'acyltransférase des gènes PKS. Cette méthode permet la détection de toutes les espèces appartenant à *A. niger* aggregate sans distinction entre espèces ochratoxinogènes et non ochratoxinogènes (Selma et al., 2009).

Plusieurs méthodes PCR suivies par un séquençage d'ADN ont été développées pour la quantification des espèces individuelles de *Fusarium* dans les grains infectés ou les tissus des plantes (Niessen, 2007). Certains tests PCR sont basés sur l'amplification de gènes à copie unique directement impliqués dans la biosynthèse des mycotoxines tandis que d'autres sont spécifiques de l'espèce (Gonzalez-Jaén et al., 2004 ; Mulé et al., 2005). Cependant, ces derniers ne sont le plus souvent spécifiques qu'à quelques espèces et ciblant la région ITS (internal transcribed spacer des unités d'ADN ribosomique) caractérisée par une variabilité limitée, ce qui ne permet pas de distinguer toutes les espèces de *Fusarium*. Afin d'élargir la gamme des espèces identifiées, d'autres tests, ciblant des gènes qui montrent un niveau élevé de polymorphisme de séquence parmi les espèces étroitement liées, ont été conçus. Ainsi, en ciblant un gène comme le gène du facteur d'élongation 1 $\alpha$  (EF1  $\alpha$ ) qui existe chez de nombreuses espèces de *Fusarium* (Kristensen et al., 2005) et qui montre une variabilité de séquence suffisante entre espèces, il est possible de concevoir des diagnostics spécifiques aux espèces permettant la détection et la quantification de la biomasse pour un large spectre d'espèces de *Fusarium* (Niessen, 2007).

### **4- Champignons mycotoxinogènes**

#### **4.1- Le genre *Aspergillus***

La plupart des *Aspergillus* sont saprobes. Ils colonisent les végétaux déjà abîmés par des blessures, des piqûres d'insectes ou infestés par d'autres champignons. Ils sont aussi présents sur la surface des graines. Dans les mauvaises conditions de stockage, ces champignons peuvent devenir des parasites. Les champignons du genre *Aspergillus* appartiennent au sous-embranchement des *Ascomycotina* par leur mode de reproduction sexuée (Hocking, 2006).

## *Synthèse bibliographique*

Le genre *Aspergillus* comprend environ 185 espèces réparties en 28 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches (Botton et al., 1990 ; Roquebert, 1998). De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement, notamment dans la poussière et l'air (Morin, 1994). Certaines espèces peuvent être directement pathogènes à l'homme et l'animal à cause de leur capacité d'envahir les tissus vivants et provoquer des aspergilloses tel que les mycoses pulmonaires (Morin, 1994). Les Aspergilli sont aussi capables de produire des mycotoxines toxiques à l'homme et l'animal. Enfin, certaines espèces d'*Aspergillus* peuvent être utilisées en industrie pour la production des enzymes et des acides organiques (Botton et al., 1990).

La majorité des *Aspergillus* poussent à une température de 22 à 25°C. Les espèces thermophiles (*A. fumigatus*) se développent à une température de 37 à 40°C (Morin, 1994). Leur croissance est rapide sur les milieux de culture nutritionnels. Ils forment des colonies poudreuses ou granuleuses. La couleur de la colonie permet d'orienter l'identification : gris-vert pour *A. fumigatus*, vert-jaune pour *A. flavus* et les espèces du groupe *A. glaucus*, vert foncé à chamois pour *A. nidulans*, brun cannelle pour *A. terreus*, chamois clair, jaune et rose pour *A. versicolor*, jaune puis noir pour *A. niger* et blanche pour *A. candidus* (Chabasse et al., 2002).

Les Aspergilli sont caractérisés par un appareil végétatif appelé thalle formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, cloisonnés et ramifiés. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés (conidiophores) qui se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées) ou portées par des petites structures insérées sur la vésicule (têtes bisériées) nommées métules ou stérigmates (Raper & Fennell, 1965). L'ensemble vésicule, métules, phialides et conidies constitue la tête aspergillaire caractéristique du genre *Aspergillus* (**figure 1**) (Chabasse et al., 2002).

## Synthèse bibliographique

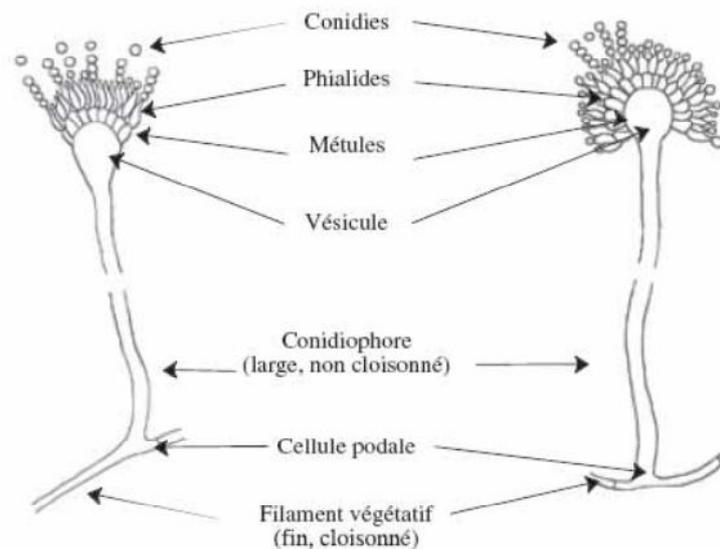


Figure 1 : Aspect microscopique des *Aspergillus* (tête bisériée) (Chabasse et al., 2002)

### 4.1.1- *Aspergillus* section *nigri*

Les champignons classés dans la section *Aspergillus nigri* (les Aspergilli noirs) sont ubiquitaires, saprobes et omniprésents dans les sols à travers le monde, en particulier dans les régions tropicales et subtropicales (Pitt & Hocking, 1997). Ils sont capables de se développer à une température comprise entre 6 et 47°C avec une température optimale de 35-37°C (Schuster et al., 2002). Ils peuvent croître à des valeurs d'activité d'eau ( $a_w$ ) allant de 0,88 et résistent à des valeurs de pH allant de 1,4 à 9,8. Ils sont donc plus présents dans les pays tempérés chauds du bassin méditerranéen et certaines régions de l'Amérique latine et de l'Afrique du Sud (Schuster et al., 2002). Dans le monde des champignons, les Aspergilli noirs sont les moisissures les plus impliquées dans la détérioration et la biodégradation des aliments. La section *Nigri* comprend 6 espèces : *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus*, *A. niger* et *A. tubingensis*. Les deux dernières espèces sont morphologiquement difficiles à distinguer et sont toutes les deux appelées communément *A. niger* ou *A. niger aggregate*. Ces deux espèces ont été récemment distinguées par leur capacité à produire l'OTA. Cependant, la production de l'OTA par *A. niger* est peu commune et ne dépassant pas 1 à 2% des isolats malgré son incidence importante par rapport à *A. carbonarius* (Heena et al., 1998 ; Chiotta et al., 2011). Des rapports récents ont confirmé la capacité d' *A. niger aggregate* à produire la Fumonisine B2 et B4 par des souches *A. niger* et *A. awamorii* isolées à partir des raisins (Varga et al., 2010 ; Chiotta et al., 2011).

## Synthèse bibliographique

### 4.1.2- *Aspergillus* section *flavi*

Selon Kurtzman et al. (1987), il existe trois espèces appartenant à la section *Aspergillus Flavi* capables de produire des aflatoxines (AFs) qui sont *A. flavus*, *A. parasiticus* et *A. nomius*. Ce sont des espèces étroitement liées et difficiles à distinguer les unes des autres. L'espèce *Aspergillus flavus* produit principalement l'AFB1 et l'AFB2, tandis que *A. parasiticus* produit les 4 aflatoxines (B1, B2, G1 et G2) (Diener et al., 1987 ; D'Mello & MacDonald, 1997). Quelques rares exceptions de sécrétion de l'AFG1 et AFG2 par *A. flavus* ont été décrites (Wicklów & Shotwell, 1983 ; Gabal et al., 1994). Enfin, *A. nomius*, une espèce rare proche d'*A. flavus*, est capable de produire les aflatoxines (Kurtzman et al., 1987).

Les espèces de la section *Flavi* sont capables de se développer à des températures comprises entre 10 et 48°C avec une température optimale de 33°C (Domsch et al., 1980). Pour l'espèce *A. flavus*, la croissance optimale se produit à une température comprise entre 19 et 35°C (Northolt et al., 1977), alors que la température optimale à la production d'aflatoxine est de 28°C (Sanchis & Magan, 2004). Ces champignons peuvent se développer à une basse  $a_w$  de l'ordre de 0,78 et à un pH allant de 2,1 à 11,2 (Ayerst, 1969 ; Olutiola, 1976). Ils sont donc présents dans les régions chaudes comme les régions tropicales et sub-tropicales.

Microscopiquement, il est impossible de distinguer les différentes espèces de la section *Flavi* du fait de la grande similarité entre elles et l'instabilité des caractères morphologiques qui caractérisent chacune d'elles. C'est pour cette raison que la distinction se base parfois sur la nature des aflatoxines produites. Certaines souches d'*A. flavus* sont également connues par leur capacité à produire l'acide cyclopiazonique (CPA) (Giorni et al., 2007).

Les espèces appartenant à la section *Flavi* contaminent divers aliments. Les aflatoxines sont généralement détectées dans les aliments des régions chaudes et humides. Elles ont été détectées dans les céréales, les noix, les graines oléagineuses, les fruits secs, les figes et le lait (Hocking, 2006 ; Medina et al., 2006).

### 4.2- Le genre *Penicillium*

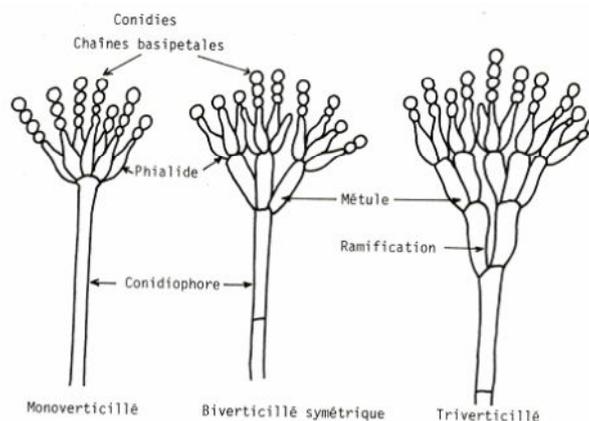
Le genre *Penicillium* est saprobe mais il peut devenir parasite en présence d'humidité au cours du stockage. Les *Penicillium* sont ubiquistes et polyphages pouvant dégrader plusieurs substrats. Ils sont largement présents dans le sol et contaminent plusieurs substrats notamment les céréales, les arachides et les produits laitiers. En terme d'incidence, les *Penicillium* sont beaucoup moins abondants que les *Fusarium* et les *Aspergillus*. Ces espèces

## Synthèse bibliographique

produisent un certain nombre de mycotoxines telles que la patuline, la citrinine, l'acide pénicillique et la roquefortine C. Le genre *Penicillium* comprend 227 espèces dont la structure est composée de thalle, des pénicilles et des spores (Pitt, 1988). Les espèces télomorphes appartiennent aux Ascomycètes. Les *Penicillium* se développent dans les milieux humides. Ils ont besoin d'une activité hydrique plus élevée que celle permettant la croissance des *Aspergillus*. Ils croissent à des températures modérées de l'ordre de 20 à 27°C. Ce sont des contaminants fréquents des régions tempérées (Pitt, 1988).

Après quelques jours d'incubation, la sporulation confère aux colonies leur teinte ce qui permet d'orienter l'identification. On distingue, à titre d'exemples, des colonies de couleur vert-gris (*P. citrinum*, *P. cyclopium*), vert-jaune (*P. chrysogenum*), vert sombre (*P. roqueforti*), blanche (*P. camemberti*) (Pitt, 1988)...

En microscopie, les *Penicillium* se distinguent par leur organisation en pinceau. Le thalle est formé d'un mycélium septé et hyalin. Il porte des conidophores simples ou ramifiés. Les phialides sont disposés en verticilles à l'extrémité des conidophores. Les phialides (cellules conidogènes) peuvent être insérées directement (*Penicillium* monoverticillé) ou par l'intermédiaire d'une ou plusieurs rangées de métules (*Penicillium* bivertricillé, trivertricillé...) (**figure 2**). Les phialides donnent naissance à des conidies qui sont des spores unicellulaires, globuleuses, elliptiques, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses, hyalines, grisâtres ou verdâtres (Botton et al., 1990). Les caractères des pénicilles servent à la distinction des groupes et des espèces.



**Figure 2 : Aspect microscopique des *Penicillium* (Chabasse et al., 2002)**

### 4.2.1- *Penicillium verrucosum*

C'est un deutéromycète, de la classe des hyphomycètes capable de produire l'ochratoxine A. *Penicillium verucosum* est une espèce ubiquiste qui se développe sur de

## *Synthèse bibliographique*

nombreux substrats notamment les céréales des zones géographiques à température modérée (Frisvad et al., 2005). Cette espèce est donc le principale producteur d'OTA dans le climat tempéré. Elle pousse entre 0 et 30°C à une température optimale de 20°C. Le pH optimal pour sa croissance se situe entre 6 et 7 et elle est capable de proliférer à une activité hydrique de 0,80  $a_w$ . Outre les céréales, *P. verrucosum* peut aussi proliférer dans un environnement complètement différent tel que les aliments riches en NaCl comme les fromages (Samson et al., 1977) ou des olives (Heperkan et al., 2009 ; Tokusoglu & Bozoglu, 2010). Cela montre l'aptitude de *P. verrucosum* de s'adapter à différents environnements. Cette espèce est aussi connue pour sa capacité à produire la citrinine au détriment de l'OTA (Schmidt-Heydt et al., 2011 ; 2015).

### **4.2.2- *Penicillium citrinum***

*Penicillium citrinum* est le principal producteur de CIT. Cette espèce est fréquemment détectée dans les céréales tels que le riz, le blé, l'orge, le maïs, les grains broyés et la farine (Pitt et Hocking, 1997). *P. citrinum* est une espèce xérophile. L'activité hydrique minimale permettant la germination est 0,82  $a_w$  dans un milieu à base de glycérol (Hocking et Pitt, 1997). La température optimale pour la croissance et la production de citrinine par *P. citrinum* est 30°C (Montani et al., 1988b).

### **4.3- Le genre *Fusarium***

Ce genre inclut des champignons anamorphes. Quelques espèces, connues par la forme parfaite ou téléomorphe, appartiennent à la classe des Ascomycètes (les genres *Gibberella*, *Calonectria* et *Nectria*). Le genre *Fusarium* comprend 40 espèces largement répandues (Nelson et al., 1983). Il renferme des espèces phytopathogènes, susceptibles d'induire des fusarioses chez de nombreuses plantes. Il regroupe aussi des espèces saprobes capables de se développer en tant que pathogènes secondaires sur des tissus végétaux sénescents. La majorité des espèces de *Fusarium* sont susceptibles de produire des mycotoxines et sont responsables d'intoxication chez les êtres humains et les animaux d'élevage. La température optimale à la croissance des *Fusarium* est comprise entre 22 et 37°C. Ils forment des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleur variable selon les espèces (Chabasse et al., 2002).

Le principal caractère morphologique des *Fusarium* est la présence des macroconidies fusiformes et cloisonnées. Les phialides présentent, le plus souvent, un site de

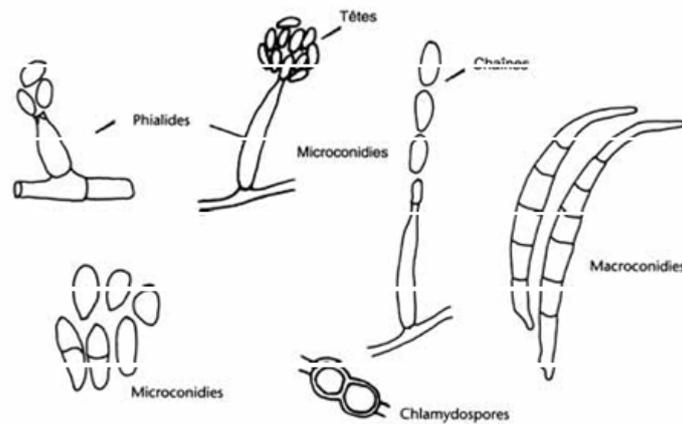
## Synthèse bibliographique

bourgeoisement unique (monophialide) situé à l'extrémité d'un col allongé (*F. solani*) ou court et trapu (*F. oxysporum*). Chez d'autres espèces comme *F. proliferatum*, les phialides présentent plusieurs sites de bourgeoisement (polyphialides) (Chabasse et al., 2002).

Les phialides produisent deux types de conidies (**figure 3**) (Chabasse et al., 2002) :

- Microconidies : uni- ou bicellulaires, piriformes, fusiformes, cylindriques ou ovoïdes, isolés, solitaires ou groupés, disposés en verticille ou plus rarement en chaînettes (*F. verticilloides*).

- Macroconidies : conidies pluricellulaires à cloisons seulement transversales. Les macroconidies sont fusiformes, souvent courbées, avec une cellule basale pédicellée, formant une sorte de talon plus ou moins visible.



**Figure 3 : Aspect microscopiques des conidies des *Fusarium* (Chabasse et al., 2002)**

### 4.3.1- *Fusarium graminearum* (forme parfaite : *Gibberella zeae*)

*Fusarium graminearum* Schwabe (forme téléomorphe: *Gibberella zeae* (Schw.) Petch) est un agent pathogène souvent présent dans les céréales ce qui provoque d'importantes pertes économiques résultant de la baisse de rendement, de la maladie de fonte de semis et de la contamination des semences avec des toxines tels que le déoxynivalénol (DON), le nivalénol (NIV) et la zéaralénone (ZEN) (Snijders, 1990 ; Tuite et al., 1990). Ce champignon forme des colonies floconneuses, de couleur rose grisâtre ou rouge à pourpre. Les microconidies sont absentes et les macroconidies sont fusiformes, courbées et septées. Le temps chaud et pluvieux au cours de la floraison favorise la contamination des épis de céréales par les *Fusarium* notamment *Fusarium graminearum* entraînant la fusariose (FHB) en Europe. La

## *Synthèse bibliographique*

gamme de température favorable à la croissance de cette espèce est comprise entre 15 et 30°C, avec une température optimale de 25°C (Marin et al., 2010).

### **4.3.2- *Fusarium section liseola***

La section *Fusarium liseola* comporte plusieurs espèces : *F. verticillioides*, *F. thapsinum*, *F. proliferatum* et *F. pseudonygamai* qui sont fréquemment rencontrées dans les céréales (Leslie & Summerell, 2006). L'espèce *F. verticillioides* infecte les plantes à toutes les étapes de développement. Elle infecte les racines, les tiges et les graines et provoque des pertes économiques énormes (Bacon et al., 1992 ; Munkvold et al., 1997). En effet, *F. verticillioides* est le principal producteur de fumonisines (Desjardins et al., 1995 ; Leslie & Summerell, 2006). Cependant, l'invasion des céréales par *F. verticillioides* n'est pas limitée aux champs, car ce champignon peut produire les fumonisines dans les grains de stockage (Scaff & Scussel, 2004). Sa forme téléomorphe est appelée *Gibberella moniliformis*, qui appartient au complexe *Gibberella fujikuroi*.

### **4.3.3- Complexe *Fusarium incarnatum-equiseti***

Le complexe *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) représente un groupe de 30 espèces morphologiquement similaires mais phylogénétiquement distinctes (O'Donnell et al., 2009, 2012), réparties uniformément en 2 sous-groupes désignés *incarnatum* et *equiseti*.

*Fusarium incarnatum* est extrêmement répandu dans les régions tropicales et subtropicales, mais aussi trouvé dans le bassin méditerranéen et, occasionnellement, dans les régions tempérées (Leslie & Summerell, 2006). La variabilité morphologique entre les espèces appartenant au sous-groupe *Incarnatum* pose quelques problèmes taxonomiques de la nomenclature (Nirenberg, 1990). Selon Leslie et Summerell (2006), *Fusarium incarnatum* est synonyme de *F. semitectum* et *F. pallidoroseum*. Bien que le nom *F. semitectum* a été utilisé dans la littérature plus que toute autre espèce au sein du sous-groupe *incarnatum*, les études ont révélé que ce nom a été mal appliqué, car il est devenu plus tard un synonyme de *Colletotrichum musae* (O'Donnell et al., 2009). Traditionnellement, *F. semitectum* est connu par sa capacité à produire la moniliformine, les trichothécènes et la zéaralénone.

*Fusarium equiseti* est un champignon cosmopolite (Burgess et al., 1994) rencontré dans toutes les régions caractérisées par un climat frais jusqu'aux zones chaudes et arides (Leslie & Summerell, 2006). Il se comporte comme un saprobe du sol associé à la pourriture des fruits et des tissus végétaux morts ou en voie de disparition, mais il peut être aussi un

## *Synthèse bibliographique*

agent pathogène d'un large éventail de cultures (Booth, 1971; Bosch & Miroba, 1992). Langseth et al. (1999) ont rapporté que les isolats de *F. equiseti* provoquent une cytotoxicité similaire à celle engendrée par les isolats toxigènes de *F. culmorum* testés sur des cellules de rein de porc. Les métabolites secondaires produits par *Fusarium equiseti* varient en volume et en toxicité. Cette espèce produit les trichothécènes, la buténolide, la beauvéricine, l'équisetine (EQ), la fusarochromanone (FUSCHR) et la zéaralénone (ZEN) (Kosiak et al., 2005 ; Leslie & Summerell, 2006).

### **5- Composition de la flore fongique des céréales et leurs dérivées**

Les céréales sont les denrées alimentaires les plus fréquemment contaminées par les mycètes. La contamination fongique est l'une des principales sources de détérioration des grains stockés. Les champignons sont capables de diminuer la capacité de germination des grains ainsi que leur valeur nutritive (Lacey et al., 1991). Les travaux réalisés sur la contamination fongique des céréales sont moins nombreux que les études menées sur l'incidence des mycotoxines. Les travaux sur la flore fongique montrent la relation entre la composition de la flore et les conditions climatiques au champs et pendant le stockage. Ainsi, les *Aspergillus* sont les plus rencontrés dans les céréales des pays chauds : 82% des échantillons d'orge en Espagne (Medina et al., 2006), 76,4%, 78% et 82,3% des échantillons de maïs produits respectivement au Ghana (Kpodo et al., 2000), en Argentine (Etcheverry et al., 1999) et au Venezuela (Medina-Martinez & Martinez, 2000) ont été trouvés contaminés par des *Aspergillus*. Le genre *Penicillium* existe aussi dans les grains stockés dans les pays chauds. Medina et al. (2006) ont montré que 57% des échantillons d'orge en Espagne, 38 à 61% et 33,4 à 54% des échantillons de blé et de seigle en Lituanie (Baliukoniene et al., 2003), 67%, 50 à 83%, 93 à 100% des échantillons de maïs d'Argentine, d'Inde et de Brésil (Janardhana et al., 1999 ; Ono et al., 1999) sont contaminés par des espèces du genre *Penicillium*.

Les *Fusarium* se développent, en général, dans les climats les moins chauds et les plus humides. Les espèces les plus fréquentes sont *F. graminearum*, dans l'orge (Usleber et al., 1996) et le maïs (Park et al., 1996b), alors que *F. verticilloides* est plus commun dans le maïs (Ono et al., 1999). Les espèces appartenant *Fusarium* sont responsables des fusarioses chez les céréales ou ce qu'on appelle « Fusarium Head Blight » (FHB). Cette pathologie est causée par l'infestation d'un complexe de deux champignons pathogènes : *Fusarium* et *Microdochium* (Simpson et al., 2001). Les espèces de *Fusarium* les plus rencontrées associées à cette

## *Synthèse bibliographique*

pathologie sont *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum* et *Fusarium poae* (Edwards et al., 2001). Cette pathologie est devenue un problème grave vue la réduction de la qualité des grains et du rendement des cultures du blé dur (Olivier et al., 2008). La conséquence la plus significative de la Fusariose est la contamination des grains par les mycotoxines du *Fusarium*, en particulier le DON, et leur risque sur la santé animale et humaine (Placinta et al., 1999).

Les pays méditerranéens sont caractérisés par un climat chaud et humide favorable à l'invasion des produits agricoles par les moisissures. En 2004, la pathologie du « Fusarium Head Blights » (FHB) a été observée dans les cultures du blé dur des régions humides et semi-arides du nord de la Tunisie. Selon Gargouri-Kammoun et al. (2009), les espèces les plus communes isolées des épis du blé infesté de la région du nord de la Tunisie sont *Microdochium nivale*-var *nivale* (63,5%), suivi par *Fusarium culmorum* (26%), *Fusarium pseudograminearum* (9%) et *Fusarium avenaceum* (1-5%). Dans une autre étude, *Fusarium culmorum* considéré comme hautement pathogène, a été le plus répandu dans toutes les cultures monosporiques isolées des échantillons du blé dur prélevés du nord de la Tunisie entre 2004 et 2007 (Fakhfakh et al., 2011). Boughaleb et al. (2006) ont rapporté la présence de six espèces de *Fusarium* dans les Fusarioses de blé survenues au nord de la Tunisie qui sont *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. avenaceum*, *F. solani* et *Microdochium nivale*. *Fusarium oxysporum* et *F. poae* ont été aussi détectées dans le blé tunisien (Boughaleb et al., 2008).

La flore fongique varie d'un substrat à un autre. Ceci est due à la différence des caractéristiques physico-chimiques entre les produits alimentaires. Il en résulte une contamination d'un aliment donné par certaines mycotoxines et pas par d'autres. Ainsi, plusieurs facteurs influent l'envahissement d'une denrée alimentaire par les mycètes et par la suite la sécrétion des mycotoxines.

### **II- Les mycotoxines**

#### **1- Introduction**

En se développant dans ou sur les denrées alimentaires, les champignons toxigènes produisent plusieurs métabolites secondaires hautement toxiques appelées couramment mycotoxines. Ces métabolites persistent tout au long de la chaîne alimentaire du fait de leur résistance aux traitements physiques et chimiques.

Le terme mycotoxine vient du grec « mycos » qui signifie champignon et du latin « toxicum » qui signifie poison. Les mycotoxines sont considérées parmi les contaminants alimentaires les plus significatifs en terme d'impact sur la santé publique et l'économie de nombreux pays (Steyn, 1995 ; Pitt et al., 2000). La majorité des espèces fongiques connues productrices de la plupart des mycotoxines appartient aux genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Alternaria* à cause de leur nature ubiquitaire (Sidhu, 2002). Les céréales, les fruits secs, les graines oléagineuses, les raisins, les grains de café et les noix sont des produits agricoles bruts très sensibles à l'infestation par les mycètes avant, pendant ou après la récolte et donc souvent contaminés par les mycotoxines (D'Mello & McDonald, 1997 ; Scudamore & Livesey, 1998). Vue leur remarquable capacité d'adaptation, les champignons contaminent aussi les produits transformés. La contamination des produits alimentaires par les mycotoxines se produit lorsqu'un ensemble de conditions environnementales au champ, ainsi que des procédés mal maîtrisés de récolte, de stockage et de transformation sont réunis (FAO, 2004).

D'une façon générale, les mycotoxines pénètrent dans le corps par la consommation d'aliments contaminés. L'exposition aux mycotoxines peut être directe par la consommation des denrées alimentaires contaminées d'origine végétale appelée voie primaire, ou indirecte par le biais de produits alimentaires d'origine animale provenant d'animaux exposés appelée voie secondaire ou toxicité de relais. D'autres voies d'exposition peuvent avoir lieu tel que l'inhalation des spores transportés dans les poussières sous forme d'aérosols en agrégats liés à des particules minérales et organiques et le contact dermique des mycotoxines (Miller, 1992 ; Jarvis & Miller, 2005).

L'exposition aux mycotoxines se traduit par des pathologies et des perturbations métaboliques appelées mycotoxicoses. Ces maladies ne sont ni infectieuses ni contagieuses, leur allure pseudo-épidémique est due à l'ingestion des mêmes toxines par l'intermédiaire d'un aliment commun. L'ingestion des aliments contaminés par des mycotoxines engendre

## *Synthèse bibliographique*

une intoxication à condition que leur concentration soit suffisamment élevée pour produire un effet biologique quelconque. Ces effets sont divers et extrêmement variables d'une mycotoxine à une autre ; on distingue les mycotoxines à effet mutagène, cancérigène, tératogène, immunodépressive, néphrotoxique, hépatotoxique et œstrogène (Miller Vincent, 2001 ; Johanning et al., 2002).

Les manifestations cliniques peuvent être soit aiguës (hémorragies, diarrhée, convulsions, tremblements, vomissement, léthargie, œdème, voire la mort), observées après exposition à une seule dose élevée, soit chroniques apparaissant après ingestion de doses modérées de toxine pendant une longue durée et se traduisant par une diminution des performances de l'animal ou de l'Homme et parallèlement à une altération de nombreux organes vitaux dont les modifications conduisent en particulier, à l'apparition de cirrhose ou d'hépatite atrophique, infiltration graisseuse au foie, hyperplasie nodulaire, cancers etc....

### **2- Historique**

Pendant des siècles, plusieurs épidémies signalées dans l'histoire humaine ont été attribuées à la consommation d'aliments moisissés mais elles sont passées presque inaperçues. Les moisissures étaient souvent considérées comme des souillures désagréables des denrées alimentaires, à l'exception de l'ergot du seigle dont l'agent causal *Claviceps purpurea* élabore l'ergotamine, une toxine mortelle responsable de plusieurs catastrophes au moyen âge. En 1900, au Japon, la consommation de « riz jaune », qu'on découvrira plus tard contaminé par une espèce de *Penicillium*, entraîne de très graves intoxication, notamment hépatique. L'ATA (aleucie toxique alimentaire) a tué des milliers d'Hommes à l'Est de la Russie entre 1942 et 1947. Bien qu'en 1950, il ait été suspecté que l'agent causal soit la toxine T-2, ce n'est que 25 ans après que cela a été confirmé (Pitt & Hocking, 1997).

Dans les années soixante du dernier siècle, des élevages de dindons en Angleterre étaient atteints d'une grave intoxication appelée maladie X des dindons « Turkey-X-Disease », provoquée par l'ingestion de tourteaux d'arachides provenant du Brésil. Les symptômes de la pathologie étaient la perte de l'appétit, la faiblesse des ailes, la léthargie et puis la mort brutale. Par la suite, il s'est révélé que ces tourteaux étaient contaminés par une moisissure appelée *Aspergillus flavus*. En 1961, des chercheurs anglais du «*Tropical Products Institute*» montraient qu'*Aspergillus flavus* produisait une substance toxique qu'ils baptisèrent aflatoxine (Adams & Moss, 2002). Par la suite, les recherches montrèrent qu'il y avait en fait

## *Synthèse bibliographique*

4 aflatoxines B1, B2, G1 et G2 dont B1 est considérée comme étant le plus puissant cancérigène connu dans le monde.

Depuis cette époque, les champignons filamenteux ont fait l'objet d'une vague de recherches et de publications à cause de leur contribution à une large part à la diminution des valeurs d'utilisation technologique, nutritionnelles et hygiéniques des produits alimentaires et à des modifications biochimiques des produits occasionnant chez l'Homme et l'animal des maladies de nature infectieuse (mycoses) et des allergies.

La liste des moisissures reconnus aptes à produire des toxines responsables de mycotoxicoses est impressionnante et ne cessent de s'allonger. Mais, seulement quelques unes sont des contaminants naturels. Les autres n'apparaissent que dans des conditions artificielles.

### **3- Les principales mycotoxines**

#### **3.1- Aflatoxines**

Les aflatoxines (AFs) représentent un groupe de dérivés structurellement apparentés au difurano-coumarine (Bhatnagar et al., 2003). Ces substances sont produites par des espèces d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus nomius* (Kurtzman et al., 1987). Elles sont extrêmement toxiques et leurs effets secondaires incluent : la carcinogénicité, la mutagénicité, la tératogénicité et l'immunosuppression (Eaton & Gallagher, 1994). Les aflatoxines les plus rencontrées dans la nature sont : AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 et AFM1 (**figure 4**). Parmi les aflatoxines, l'AFB1 est la plus fréquente et la plus toxique. Elle est considérée comme étant le plus puissant hépatocancérigène pour les mammifères et elle est classée en tant que cancérigène probable du groupe 1 par l'agence internationale de la recherche sur le cancer (IARC) (IARC, 1993).

L'AFM1 est un dérivé monohydroxylé de l'AFB1 produit par les cytochromes P-450 au cours du métabolisme hépatique et secrété dans le lait (figure 1). L'AFM1 est cancérigène pour l'être humain et elle est classée par l'IARC dans le groupe 1 (IARC, 2002).

## Synthèse bibliographique

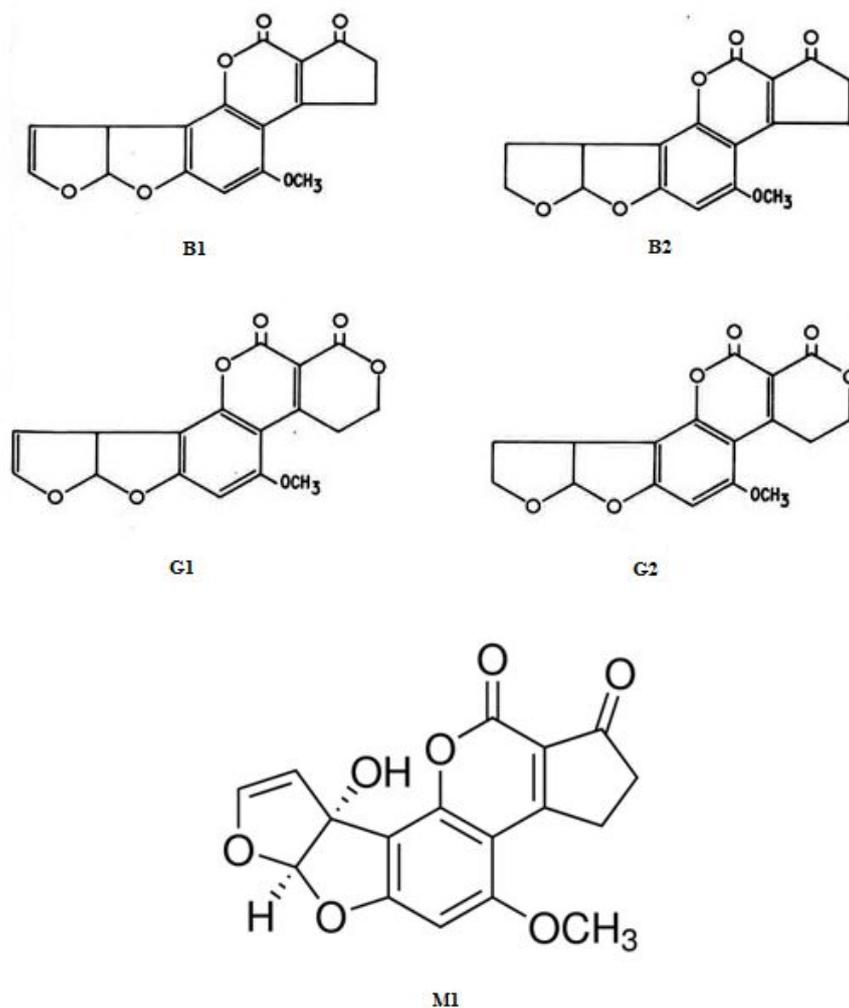


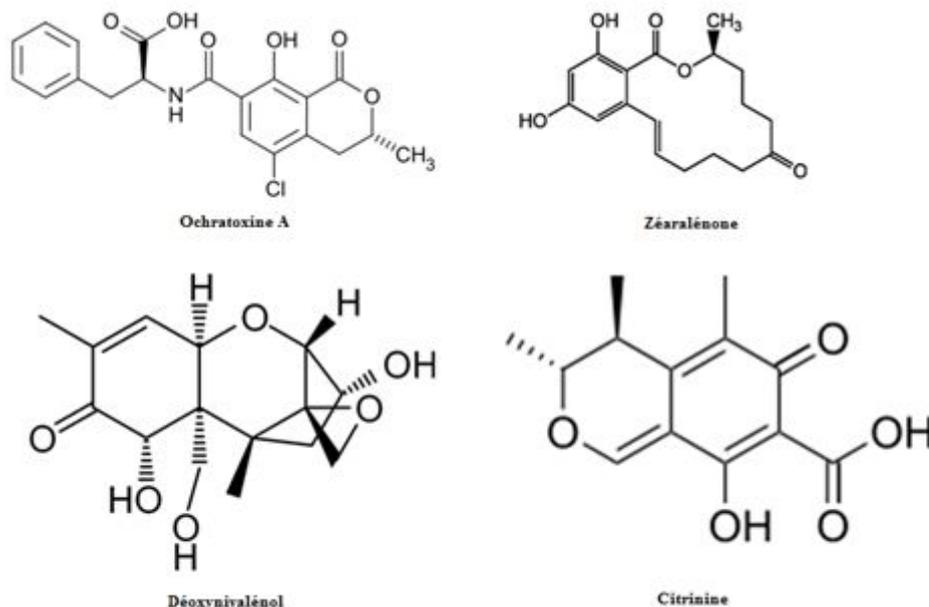
Figure 4 : Structure des principales aflatoxines : B1, B2, G1, G2 et M1

### 3.2- Ochratoxine A

L'ochratoxine A est un dérivé de phénylalanine produit par des espèces du genre *Penicillium* et *Aspergillus* (Pitt & Hocking, 1997) (**figure 5**). L'OTA est connue par ses propriétés néphrotoxiques, cancérigènes, immunotoxiques, génotoxiques et tératogènes pour toutes les espèces animales testées (Pitt et al., 2001). En effet, l'agence internationale de recherche sur le cancer (IARC) a classé l'OTA dans le groupe 2B comme un composé cancérigène pour l'Homme (IARC, 1999). Après consommation d'aliments contaminés, l'OTA est fréquemment détectée dans le sang humain. Elle est caractérisée par une longue demi-vie d'élimination (environ 35 jours dans le sérum), à cause de sa liaison aux protéines plasmatiques, sa circulation entéro-hépatique et sa réabsorption dans l'urine (Studer-Rohr et

## Synthèse bibliographique

al., 2000). Par conséquent, l'OTA est la mycotoxine la plus détectée dans le sang humain dans le monde (Pena et al., 2006).



**Figure 5 : Structures de l'ochratoxine A, la zéaralénone, le déoxynivalénole et la citrinine**

Cette toxine a été impliquée dans une pathologie humaine mortelle de la région des « Balkans » au sud-est de l'Europe caractérisée par des tumeurs des voies urinaires (Pfohl-Leszkowicz et al., 2002 ; Monaci & Palmisano, 2004). Dans les pays du Nord d'Afrique, plusieurs auteurs ont mentionné une incidence élevée des néphropathies interstitielles chroniques liées à la consommation des aliments contaminés par l'OTA. Ainsi, 60% des échantillons de sang prélevés de la population marocaine se sont avérées contaminés par l'OTA (Filali et al., 2002). En Tunisie, les résultats de certains travaux considèrent que l'OTA est une cause de néphropathie interstitielle chronique (CIN) (Maaroufi et al., 1996 ; Abid-Essafi et al., 2003). Ces résultats ne sont pas confirmés par certains auteurs (Mabrouk et al., 2000 ; Grosso et al., 2003).

### 3.3- Zéaralénone

La zéaralénone (ZEN) est une mycotoxine de structure œstrogénique non-stéroïde produite par des espèces du genre *Fusarium* tel que *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum* (Bennett & Klich, 2003) (**figure 5**). La zéaralénone se lie compétitivement aux récepteurs d'œstrogène et elle est par conséquent connue par ses effets œstrogéniques

## *Synthèse bibliographique*

incluant : l'infertilité, diminution du taux de la testostérone sérique et du nombre des spermatozoïdes, réduction du taux de grossesse et des changements des taux de progestérone (Shier et al., 2001). ZEN est également considérée cancérigène et classée par l'IARC dans le groupe 3 (IARC, 1999). Elle est aussi responsable de complications hépatotoxiques (Conkova et al., 2001) et hématotoxiques (Abbes et al., 2006). Plusieurs études ont montré que la ZEN présente des effets génotoxiques tels que l'induction des micronoyaux et les aberrations chromosomiques, des cassures des brins d'ADN et formation des adduits (Abbes et al., 2006, 2007).

### **3.4- Trichothécènes**

Les trichothécènes sont un groupe de mycotoxines produites principalement par des espèces appartenant aux genres *Fusarium*, *Myrothecium*, *Phomopsis* et *Trichoderma*. Toutes les trichothécènes ont en commun un 12, 13-époxytrichothécène et un acide olifénique avec une variété de substituants (Bennett & Klich, 2003). Les trichothécènes sont classées en 4 groupes A, B, C et D selon leur structure chimique (WHO, 1990). Elles provoquent principalement une nécrose et une hémorragie pendant les processus de régénération du sang dans la moelle osseuse et la rate et des changements des organes reproducteurs. Les signes de pathologie sont : la perte de poids, la perte d'appétit, les vomissements, la diarrhée, l'avortement et la mort. L'immunosuppression peut être très importante chez les animaux intoxiqués par les trichothécènes (Anon & CAST, 1989).

Le Déoxynivalenol est la mycotoxine la plus abondante des trichothécènes du groupe B, qui sont des époxy-sesquiterpénoïdes (Clear & Patrick, 2000 ; Eriksen & Pettersson, 2004) (**figure 5**). Cette toxine appelée aussi vomitoxine, est principalement produite par *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum* (Desjardins & Proctor, 2001). Son accumulation dans l'organisme humain ou animal peut engendrer des effets secondaires sur la santé après une administration aiguë ou chronique (Desjardins, 2006), y compris des effets tératogènes, neurotoxiques, embryotoxiques et immunosuppressives (Pestka, 2007).

### **3.5- Citrinine**

La citrinine (CIT) est produite principalement par *Penicillium citrinum* mais aussi par *Penicillium expansum* et *Penicillium verrucosum* et quelques espèces du genre *Aspergillus* et *Monascus* (Kurata, 1990 ; Li et al., 2003) (**figure 5**). La CIT est toxique pour l'Homme et l'animal (CAST, 2003). Plusieurs études ont montré que la CIT est cytotoxique, génotoxique,

## Synthèse bibliographique

mutagène, immunotoxique et tératogène (Liu et al., 2003 ; Bouslimi et al., 2008). La toxicité de cette mycotoxine est due à sa propriété néphrotoxique (Chagas et al., 1992).

### 3.6- Fumonisines

Les fumonisines sont synthétisées principalement par plusieurs espèces du genre *Fusarium* y compris *Fusarium verticillioides* et *Fusarium proliferatum* (Chen et al., 1992). Plusieurs fumonisines sont isolées et caractérisées mais FB1, FB2 et FB3 sont les plus fréquemment détectées dans les produits alimentaires (**figure 6**). La FB1 est un diester d'acide propane-1,2,3- tricarboxylique (**figure 6**).

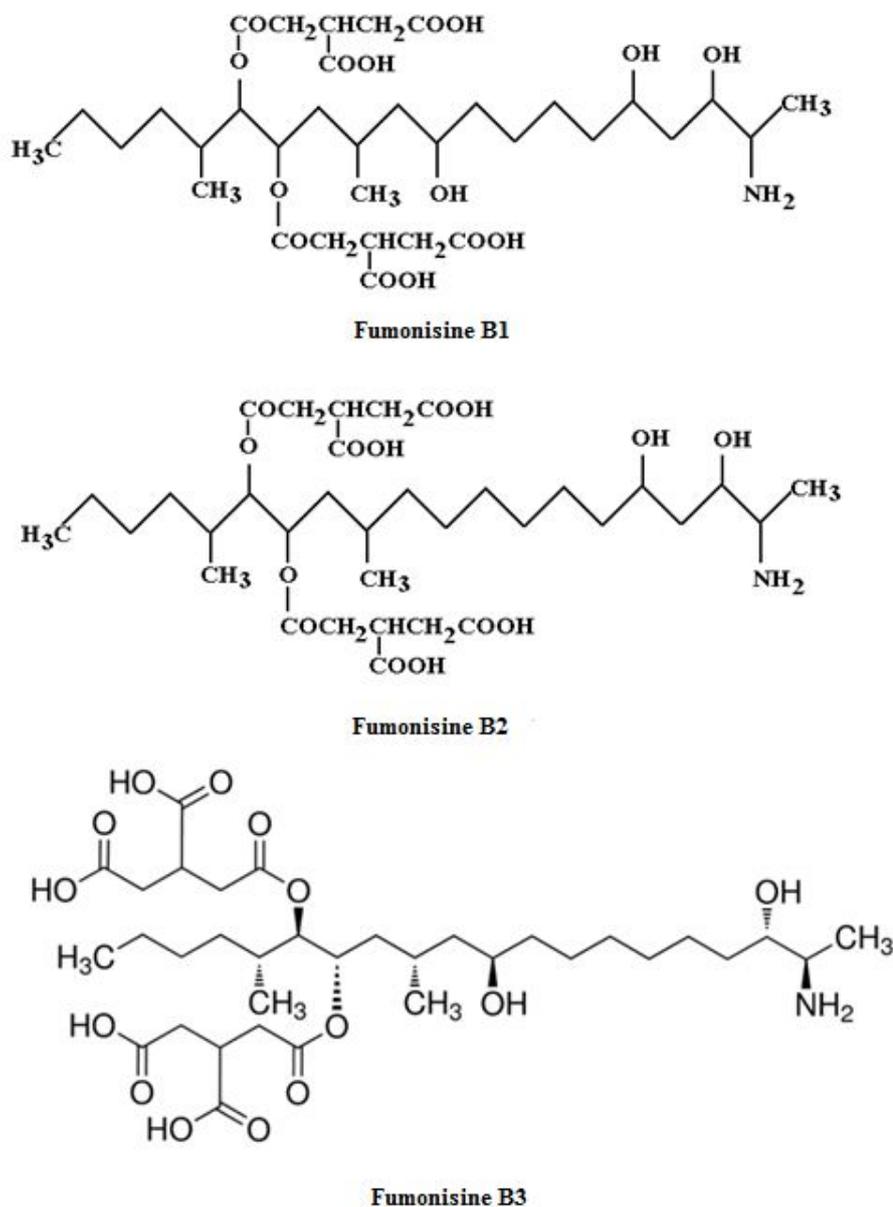


Figure 6 : Structure des fumonisines B1, B2 et B3

## *Synthèse bibliographique*

Les fumonisines sont des cancérogènes probables et elles sont classées parmi le groupe 2B selon l'IARC et l'OMS (WHO-IARC, 1993). L'incidence du cancer oesophageal dans certains pays est liée à la contamination du maïs par les fumonisines (Rheeder et al., 1992 ; Chu & Li, 1994). Ces substances ont été prouvées responsables de la promotion du cancer du foie chez plusieurs espèces animales (Marasas et al., 1988b ; Gelderblom et al., 1992).

### **4- Contamination des céréales et leurs dérivés par les mycotoxines**

Les céréales représentent la source d'alimentation la plus importante dans le monde, soit par consommation humaine directe, soit indirectement par leur utilisation dans l'alimentation du bétail. Les dernières prévisions de la FAO ont indiqué que la production céréalière mondiale a augmenté en 2011 de 3,3% par rapport à 2010 pour atteindre 2313 millions de tonnes (FAO, 2011). Dans les pays de l'union européenne, la production totale des céréales a été estimée à 283 et 272 millions de tonnes respectivement pendant 2011 et 2012 (Anonyme1, 2013). Bien évidemment, cette production élevée doit être conforme aux normes de sécurité des aliments destinés à l'Homme et l'animal vue l'impact économique et sanitaire de ce type d'aliments. Les céréales sont probablement la source la plus importante d'apport en mycotoxines. Devegowda et al. (1998) ont indiqué qu'environ 25% des céréales consommées dans le monde sont contaminées par les mycotoxines. Le blé est souvent contaminé par le DON et la zéaralénone, alors que le maïs est principalement contaminé par le DON puis les fumonisines (Rodrigues & Naehrer, 2012). Des teneurs élevées d'aflatoxines peuvent se retrouver dans le sorgho (Da Silva et al., 2000).

## Synthèse bibliographique

Le **tableau 1** montre quelques résultats d'études réalisées dans divers pays sur l'incidence de certaines mycotoxines dans les céréales et les produits dérivés.

**Tableau 1 : Occurrence des mycotoxines dans les céréales à travers le monde**

Aliments	Mycotoxines	Incidence (%)	Gamme de concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Références
Maïs	DON	88	2,7 - 311,2	Jina et al., 2010
	ZEN	90	2,7 - 167,2	
	OTA	1,50		
Céréales du petit-déjeuner	DON	72	<LOQ - 524,6	Cunha & Fernandes, 2010
	ZEN	66	28,2 - 66,6	
Blé dur	FB1, FB2, FB3	96	10,5 - 1245,7	Palacios et al., 2011
Céréales et dérivés	Afs	10	4,2 - 66,7	Serrano et al., 2012
	OTA	1,50	75 - 112	
Blé	CIT	50	1 - 170	Zaied et al., 2012a
Bière	ZEN	5,70	LOD - 10	EFSA, 2011
Sorgho	AFB1	12,8	7 - 33	Da Silva et al., 2000

Dans les pays de l'Afrique du Nord, les céréales telles que le blé, l'orge, le sorgho, le maïs ainsi que leurs dérivés représentent un aliment de base pour la population. De grandes quantités de blé sont utilisées sous forme de couscous, pâtes, frik, pain, des aliments qui caractérisent la gastronomie de ces pays. En outre, les céréales contribuent à environ 12% de la production en Tunisie et les ménages tunisiens consacrent environ 25% de leurs dépenses alimentaires pour ce type de produits. Il faut signaler que de grandes quantités de céréales commercialisées en Tunisie sont importées et on connaît peu sur leur contamination éventuelle par les mycotoxines. Le blé dur est la céréale la plus cultivée en Tunisie couvrant environ 700 000 ha chaque année, principalement localisés au nord du pays (Bensassi et al., 2010). La Tunisie, comme tous les autres pays de l'Afrique du Nord, est entourée par la mer Méditerranée. Son climat humide et chaud favorise l'envahissement des céréales par les moisissures et leur contamination par les mycotoxines. Bensasi et al. (2010) ont montré que 83% des échantillons de blé cultivé en Tunisie sont contaminés par des teneurs élevées en DON supérieures à la limite autorisée par la commission européenne (1750  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (European Commission, 2006a).

Le blé tunisien est aussi contaminé par la ZEN (Zaied et al., 2012b), la CIT (Zaied et al., 2012a), les aflatoxines (Ghali et al. 2010) et l'OTA (Zaied et al., 2009 ; Ghali et al.,

## *Synthèse bibliographique*

2009b). Plusieurs chercheurs ont étudié l'occurrence des mycotoxines dans les autres céréales en Tunisie ; le sorgho et l'orge ont été démontrés contaminés par l'AFB1 (Saïd et al., 1998 ; Ghali et al., 2009a ; Ghali et al., 2010) et l'OTA (Ghali et al., 2009b ; Zaïed et al. 2009).

### **5- Biosynthèse des mycotoxines**

Les mycotoxines font partie des métabolites secondaires, qui ne jouent pas de rôle évident dans le métabolisme du microorganisme. Ce sont probablement un moyen de défense pour les champignons contre les parasites ou contre les autres micro-organismes en concurrence dans le même environnement (Adams, 2002). Ces composés non essentiels au métabolisme basique des moisissures sont produits au cours de l'idiophase (phase stationnaire) à partir des précurseurs issus du métabolisme primaire, tels que l'Acétyl-CoA, les acides aminés, les phénols ou les composés terpéniques (Steyn, 1998). Les voies de biosynthèse sont longues et complexes et les réactions sont catalysées par des enzymes de spécificité différente de celle du métabolisme primaire (Steyn, 1980).

Contrairement au métabolisme primaire, qui est fondamentalement le même pour tous les êtres vivants, le métabolisme secondaire dépend de l'espèce considérée, et très souvent de la souche. La nature des métabolites secondaires, très hétérogènes, dépend des caractères individuels de la souche et des conditions environnementales (Steyn, 1980).

Le métabolisme secondaire, très important chez les moisissures, aboutit à une grande diversité de molécules dont les mycotoxines. Ces produits sont très souvent classés par famille de produits chimiquement voisins (les aflatoxines, les trichothécènes, etc.). Elles ont trois origines biosynthétiques principales : la voie des polyacétates, celle des terpènes et celle des acides aminés (Tabuc, 2007) (**figure 7**).

## Synthèse bibliographique

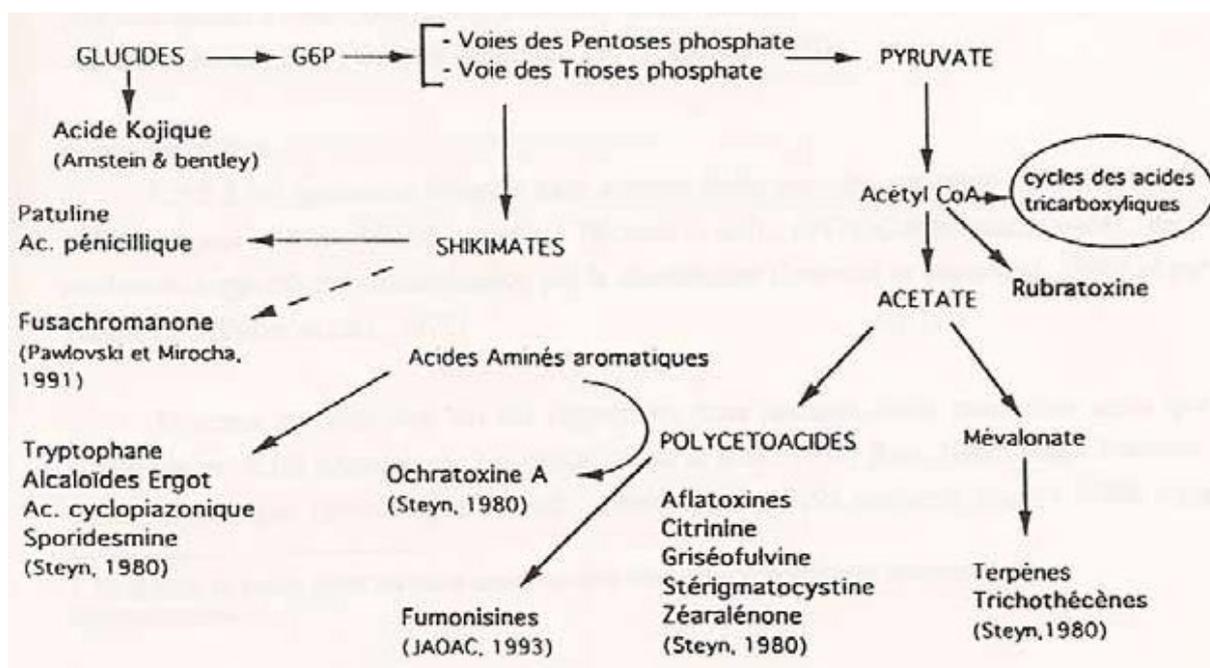


Figure 7 : Voies de biosynthèse des mycotoxines (Tabuc, 2007)

### 6- Régulation et législation des mycotoxines dans le monde

Comme les mycotoxines ne peuvent jamais être complètement éliminées des aliments, de nombreux pays ont défini des teneurs maximales, dans les denrées alimentaires, qui ne sont pas susceptibles de provoquer des problèmes de santé et qui sont raisonnablement possibles à atteindre en suivant les bonnes pratiques de culture, de fabrication et de stockage. Plusieurs facteurs peuvent influencer l'élaboration des réglementations concernant les mycotoxines, y compris la disponibilité des données toxicologiques, la disponibilité des données de l'incidence des mycotoxines dans les différents produits, la législation dans d'autres pays avec lesquels des échanges commerciaux existent pour assurer une alimentation suffisante et les caractéristiques socio-économiques des peuples du monde (Van Egmond et al., 2007). La stratégie intégrée de l'Union Européenne (EU) vise à assurer un niveau élevé de sécurité alimentaire, de préserver la santé des animaux et la lutte contre les pathologies des plantes au sein des pays de l'Union Européenne (EU) par des mesures cohérentes et une surveillance adéquate, tout en gardant la production élevée et en assurant le fonctionnement du marché intérieur. L'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) est la structure de l'Union Européenne responsable de l'évaluation des risques relatifs à la sécurité des aliments destinés à la consommation humaine et animale. L'évaluation du risque se fait à deux niveaux (Van Egmond et al., 2007) :

## Synthèse bibliographique

- Au niveau européen, cette évaluation est réalisée par le comité scientifique de l'alimentation humaine (CSAH) afin d'établir la toxicité des mycotoxines, des facteurs de sécurité et émettre les avis qui serviront pour les législations applicables en Europe.
- Au niveau international, cette évaluation est réalisée par JECFA (joint expert committee of food and additives) qui analyse également la toxicité des mycotoxines et élabore les recommandations au niveau du *Codex Alimentarius*.

Les législations européennes et les normes du *Codex Alimentarius* ne sont pas forcément identiques. Dans le cas des mycotoxines, la législation européenne est souvent plus sévère que les normes du codex. La réglementation et les recommandations de l'EU liées au contrôle des céréales sont résumées dans le **tableau 2**.

**Tableau 2 : Teneurs maximales en mycotoxines dans divers aliments destinés à l'Homme (European Commission, 2002 ; 2006b ; 2007 ; 2010) et l'animal (The European Parliament and Council, 2002 ; European Commission, 2006a)**

Mycotoxines	Denrées alimentaires	Niveau Maximal (µg/kg)
<b>Aflatoxine B1</b>	Toutes les céréales et leurs dérivés destinés à l'alimentation humaine	2
	Maïs et riz avant tout traitement physique et destinés à la consommation humaine	5
<b>Aflatoxines B1, B2, G1 et G2</b>	Toutes les céréales et leurs dérivés destinés à l'alimentation humaine	4
	Maïs et riz avant tout traitement physique et destinés à la consommation humaine	10
<b>Déoxynivalenol</b>	Céréales non transformées autres que le blé dur, l'avoine et le maïs	1250
	Blé dur et avoine non transformées	1750
	Céréales destinées à la consommation humaine directe, farine, son et germe en forme de produit fini pour consommation humaine directe	750
	Pain, pâtisseries, biscuits, collations aux céréales et céréales pour petit déjeuner	500
	Aliments transformés à base de céréales et les aliments destinés aux nourrissons et les jeunes enfants	250
	Céréales et aliments à base de céréales destinés aux animaux	8000

## Synthèse bibliographique

	Produits à base de maïs destinés aux animaux	12000
<b>Zéaralénone</b>	Céréales non transformées autres que le maïs	100
	Maïs non transformé	350
	Céréales destinées à la consommation humaine directe, farine, son et germe en forme de produit fini pour consommation humaine directe	75
	Pain, pâtisseries, biscuits, collations aux céréales et céréales pour petit déjeuner à l'exception aux produits à base de maïs	50
	Maïs destiné à la consommation humaine directe, collations à base de maïs et de céréales pour petit déjeuner à base de maïs	100
	Aliments transformés à base de céréales et les aliments destinés aux nourrissons et les jeunes enfants	20
	Céréales et aliments à base de céréales destinés aux animaux	2000
	Produits à base de maïs destinés aux animaux	3000
	<b>Ochratoxine A</b>	Céréales non transformées
Produits dérivés de céréales non transformés et céréales transformées et produits destinés à la consommation humaine directe		3
Aliments transformés à base de céréales et les aliments destinés aux nourrissons et les jeunes enfants		0,05
Céréales et aliments à base de céréales destinés aux animaux		250
<b>Fumonisine B1 + B2</b>		Maïs destiné à la consommation humaine directe, aliments à base de maïs destinés à la consommation humaine directe
	Céréales pour petit déjeuner à base de maïs et de collations à base de maïs	800
	Aliments transformés à base de maïs destinés aux nourrissons et les jeunes enfants	200
	maïs et aliments à base de maïs destinés aux animaux	60

---

Par rapport aux années 90, plusieurs pays ont établi des législations pour de nombreuses mycotoxines et pour plus de produits jusqu'à 2002. En Afrique, quinze pays sont connus pour avoir des réglementations spécifiques de mycotoxines dont la plupart concernent les aflatoxines. La Tunisie a mis en place un niveau maximal tolérable d'aflatoxines dans diverses denrées alimentaires et qui correspond à 2 ng/g (INNORPI, 1983). En Egypte, la limite tolérable pour l'AFB1 a été fixée à 5 µg/kg dans les céréales (sauf le maïs) et 10 µg/kg

## Synthèse bibliographique

dans le maïs, alors que pour les aflatoxines totales, la limite tolérable a été fixée à 10 µg/kg pour toutes les céréales à l'exception du maïs dont la teneur maximale tolérable a été fixée à 20 µg/kg. La teneur maximale en AFB1 tolérée en Algérie est 10 µg/kg (FAO, 2004). Le Maroc semble avoir la réglementation la plus détaillée sur les mycotoxines en Afrique (FAO, 2004). Des règlements ont été établis par le Comité Interministériel pour le contrôle des aliments et la répression des fraudes (CIPCARF) sur les limites de l'AFB1, l'OTA et la ZEN dans les céréales destinées à la consommation humaine, de l'AFM1 dans le lait et dérivés pour les enfants et les adultes et la limite maximale de la patuline dans les fruits et les jus. Le Maroc a fixé aussi des législations concernant l'AFB1 dans les aliments destinés aux animaux. **Le tableau 3** montre des limites pour les mycotoxines dans les denrées alimentaires et les matières premières dans les pays de l'Afrique du Nord.

**Tableau 3: Teneurs maximales en mycotoxines dans divers aliments destinés à l'Homme dans quelques pays de l'Afrique du Nord (INNORPI, 1983 ; FAO, 2004 ; Zinedine et al., 2006)**

Mycotoxines	Denrées alimentaires	Maroc	Tunisie	Algérie	Egypte
<b>AFB1</b>	Farine de blé	3			
	Céréales	10	2	10	5
	Maïs				10
	arachides, pistaches, noix et amandes	1			
	arachides et graines oléagineuses				5
<b>Aflatoxines B1, B2, G1 et G2</b>	Céréales sauf maïs				10
	maïs				20
	arachides et graines oléagineuses				10
<b>Aflatoxine M1</b>	Lait destiné aux adultes	0,05			0,5
	Lait destiné aux enfants	0,03			
<b>Ochratoxine A</b>	Céréales	30			
	Café				5
<b>Zéaralénone</b>	Céréales	200			1000
<b>Déoxynivalenol</b>	Blé et farine de blé				700
	Orge et farine d'orge				1000

### **III- Conditions de contamination des aliments par les moisissures**

#### **1- Conditions de la croissance fongique**

Les champignons filamenteux sont des microorganismes hétérotrophes : elles ne se développent que sur un milieu contenant les éléments nutritifs nécessaires. La paroi rigide de la cellule fongique l'empêche de phagocyter les substances nutritives complexes dans le milieu extérieur. Grâce à la sécrétion des enzymes dans l'environnement, les champignons transforment les polymères complexes en molécules simples absorbables (Dragacci et al., 2011).

Comme tout microorganisme, la croissance fongique dépend de plusieurs facteurs qui sont soit intrinsèques (liés à la souche) soit extrinsèques (propriétés physiques, chimiques ou biologiques de l'écosystème) (Pitt & Hocking, 1997).

#### **1.1- Facteurs physiques affectant la croissance fongique**

##### **1.1.1- Activité de l'eau**

L'importance de l'eau pour toute forme de vie, dont les microorganismes, est bien connue. Pour leur croissance dans un substrat donné, les microorganismes ont besoin d'utiliser l'eau disponible dans ce substrat pour assurer le déroulement de leurs réactions métaboliques. La teneur en eau dans un substrat se divise en deux parties : une eau retenue et une eau libre. En 1957, Scott a été le premier à déterminer l'importance de la disponibilité de l'eau et à établir une corrélation entre celle-ci et la teneur totale en eau des substrats. Il a proposé l'activité de l'eau ( $a_w$ ) qui décrit le mieux la disponibilité de l'eau. Il s'agit de la quantité d'eau libre non liée aux sels, sucres ou protéines et qu'une fois le substrat est envahi par un microorganisme quelconque, ce dernier peut l'utiliser pour son métabolisme. Ainsi, l' $a_w$  représente le rapport entre la pression de la vapeur de l'eau dans un substrat (P) et la pression de la vapeur de l'eau pure ( $P_0$ ) à la même température et à la même pression (Pitt & Hocking, 1997) :

$$a_w = P/P_0$$

L'activité de l'eau d'un substrat dépend de sa composition chimique et de ses caractéristiques physiques (sa porosité, sa polarité). Elle est faible lorsque toute l'eau contenue dans le substrat est retenue et la pression de la vapeur est beaucoup plus inférieure à celle de l'eau. L' $a_w$  de l'eau pure est égale à 1. Une autre mesure de l' $a_w$  est celle du potentiel hydrique ( $\Psi$ ), qui est couramment utilisé en microbiologie du sol et mesurée en Pascals (Pa).

## Synthèse bibliographique

Le potentiel hydrique ( $\Psi$ ) est la somme des potentiels osmotiques, matriciels et de turgescence et il est lié directement à l' $a_w$  par la formule suivante (Pitt & Hocking, 1997) :

$$\text{Potentiel hydrique } (\Psi) = RT/V \log_n a_w (+P)$$

R est la constante des gaz parfaits, T la température absolue, P la pression atmosphérique et V le volume de 1 mol d'eau. L' $a_w$  et l'humidité relative d'équilibre (HRE) sont les mêmes, sauf que numériquement l' $a_w$  est une fraction décimale de 1 et HRE est la relation entre  $a_w$  et  $\Psi$ , qui est exprimée en pourcentage (%) (Magan, 2007). Si un échantillon de nourriture est maintenue dans une enceinte étanche à une température constante jusqu'à ce que l'eau contenue dans l'échantillon s'équilibre avec de la vapeur d'eau dans l'espace aérien fermé, on aura :

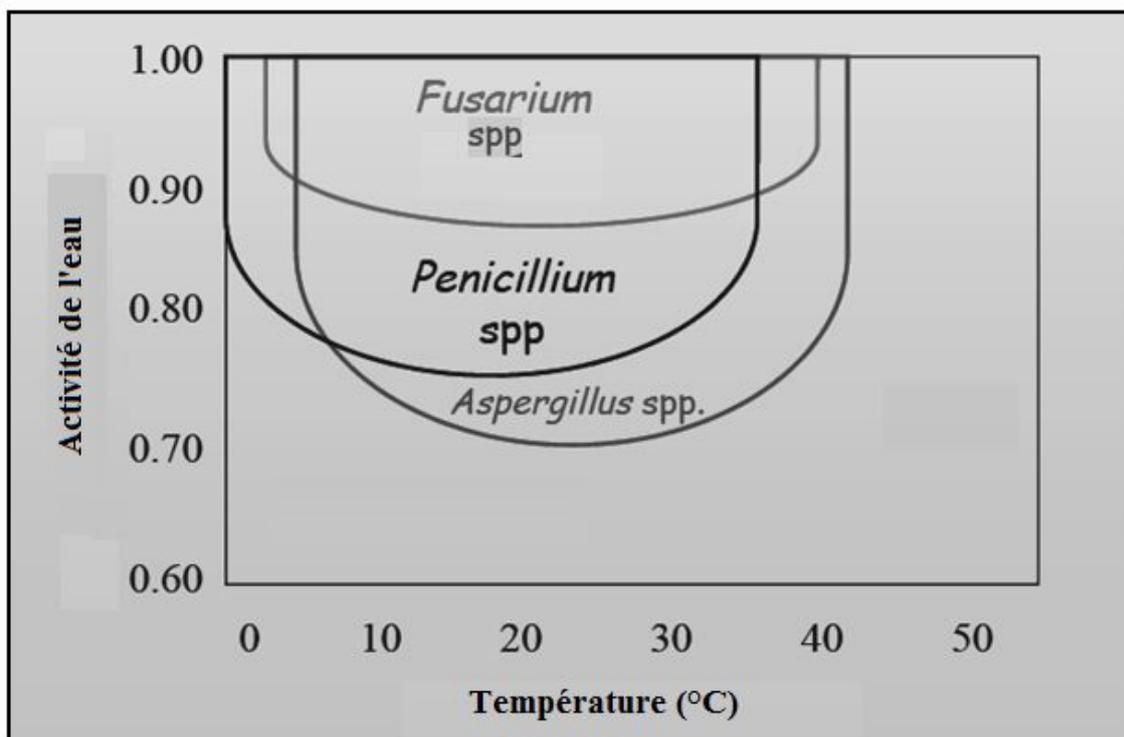
$$a_w (\text{aliment}) = \text{HRE (air)}/100$$

Inversement, si la HRE de l'air est contrôlée par un moyen approprié, par exemple une solution saline saturée, à l'équilibre, l' $a_w$  de la nourriture sera numériquement égale à la HRE générée. De cette façon,  $a_w$  peut être expérimentalement contrôlée, et la relation entre l' $a_w$  et l'humidité (l'isotherme de sorption) peut être étudiée (Pitt & Hocking, 1997).

L'exigence minimale pour la croissance microbienne est de 0,62  $a_w$ , qui permet la croissance des levures xérophiles (Chirife & Buera, 1994). Une  $a_w$  croissante permet la croissance des moisissures, d'autres levures et enfin des bactéries dans les conditions les plus humides. La valeur 0,86  $a_w$ , qui permet la croissance de *Staphylococcus aureus* pathogène pour l'Homme, est la plus importante pour la sécurité des produits alimentaires. Pitt et Hocking (1985) ont rapporté que les ascomycètes comprennent la plupart des organismes capables de croître à  $<0,90 a_w$ . L' $a_w$  de l'eau joue un rôle primordial dans la croissance des champignons filamenteux en particulier sur la germination des spores et la croissance des mycélium. Par ailleurs, pour une température donnée, chaque espèce de mycètes exige une activité d'eau optimale pour la germination de spores, la croissance, la sporulation et la formation de métabolites. L'exigence vis-à-vis de l'eau et la tolérance des moisissures sont variables d'une souche à l'autre. Les mycètes sont plus xérotolérantes (s'adaptent aux milieux secs) que les autres microorganismes. La plupart des mycètes se développent bien pour des activités en eau voisines de 0,85. Par conséquent, beaucoup de produits dont l'activité hydrique ne permet pas la croissance bactérienne peuvent être colonisés par les moisissures. Les champignons appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont généralement xérophiles et capables de se développer à des  $a_w$  voisines de 0,7 à 25 °C ; elles peuvent donc

## Synthèse bibliographique

se développer dans les aliments pauvres en eau comme les céréales au stockage, les fruits secs, les produits dont l'activité hydrique a été réduite (produits de salaison sèche, confitures...) (Castegnaro & Pfohl-Leskowicz, 2002). Marin et al. (2009) ont estimé que l' $a_w$  optimale pour la croissance de deux souches *A. flavus* est comprise entre 0,97 et 0,99  $a_w$  alors que l' $a_w$  minimale pour la croissance varie entre 0,82 et 0,88  $a_w$ . Un niveau optimal de croissance de quelques souches d'*A. ochraceus* a été observé à une  $a_w$  comprise entre 0,96 et 0,98  $a_w$  (Ramos et al., 1998). Par contre, les *Fusarium* ne peuvent se développer que pour des  $a_w$  supérieures à 0,9 (Castegnaro & Pfohl-Leskowicz, 2002) (**figure 8**). L' $a_w$  est un des facteurs à contrôler pour assurer la sécurité sanitaire des aliments.



**Figure 8 : Profils schématiques des limites croissance/pas de croissance pour les genres *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium* (Magan et al., 2015)**

### 1.1.2- Température

La température conditionne le développement de la flore fongique et surtout sa vitesse de croissance. La température peut soit inhiber les réactions enzymatiques par dénaturation des enzymes en cas de l'élévation de la température, soit provoquer la diminution de la vitesse des activités enzymatiques en cas de baisse de température. La plupart des champignons sont mésophiles avec des optima de croissance variant de 25 à 35°C. La croissance des *Fusarium* est plus favorable dans les climats tempérés à des températures allant de 26 à 28°C, tandis que

## *Synthèse bibliographique*

les *Aspergillus* prolifèrent mieux sous des températures chaudes. Pour *Aspergillus ochraceus* par exemple, la température optimale de croissance se situe entre 25 et 30°C (Ramos et al., 1998). Certaines espèces sont psychrophiles ou psychrotolérantes et sont capables de se développer à des températures relativement basses comme les champignons du genre *Penicillium* dont l'intervalle de température varie de 4°C à 31°C avec un optimum à 12°C. **La figure 8** est une représentation schématique de l'effet combiné de la température et de l'activité de l' $a_w$  sur la croissance des genres *Fusarium*, *Penicillium* et *Aspergillus*.

### **1.1.3- Composition gazeuse**

Les moisissures sont, pour la plupart, des microorganismes strictement aérobies ; ils ont besoin d'oxygène pour une croissance normale. Toutefois, leur développement est peu affecté par des teneurs de 10 fois plus faible (2,1%) que celle de l'atmosphère. En conséquence, certaines espèces de moisissures peuvent se développer sur les denrées alimentaires dans une atmosphère pauvre en O<sub>2</sub>. C'est le cas d'*Aspergillus flavus* qui tolère des pressions très faibles en O<sub>2</sub>. Par contre, pour d'autres moisissures, comme *Fusarium proliferatum*, dépendants de l'oxygène, la biomasse fongique se trouve considérablement réduite en absence d'O<sub>2</sub> (Keller et al., 1997). Certaines espèces peuvent se développer en anaérobiose : c'est le cas de *Byssochlamys* qui contaminent les jus de fruits conservés par pasteurisation (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

La concentration en CO<sub>2</sub> influence aussi la croissance fongique et intervient au niveau de l'intensité respiratoire. L'élévation de la pression de CO<sub>2</sub> dans le milieu inhibe la croissance fongique. Ainsi, le développement d'*Aspergillus ochraceus* est complètement inhibé par une teneur de 80% de CO<sub>2</sub> (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

### **1.1.4- Facteur temps**

L'étude de l'évolution des différents paramètres sur la prolifération de la flore fongique en fonction du temps détermine la durée du stockage à ne pas dépasser, au-delà de laquelle le produit alimentaire s'altère.

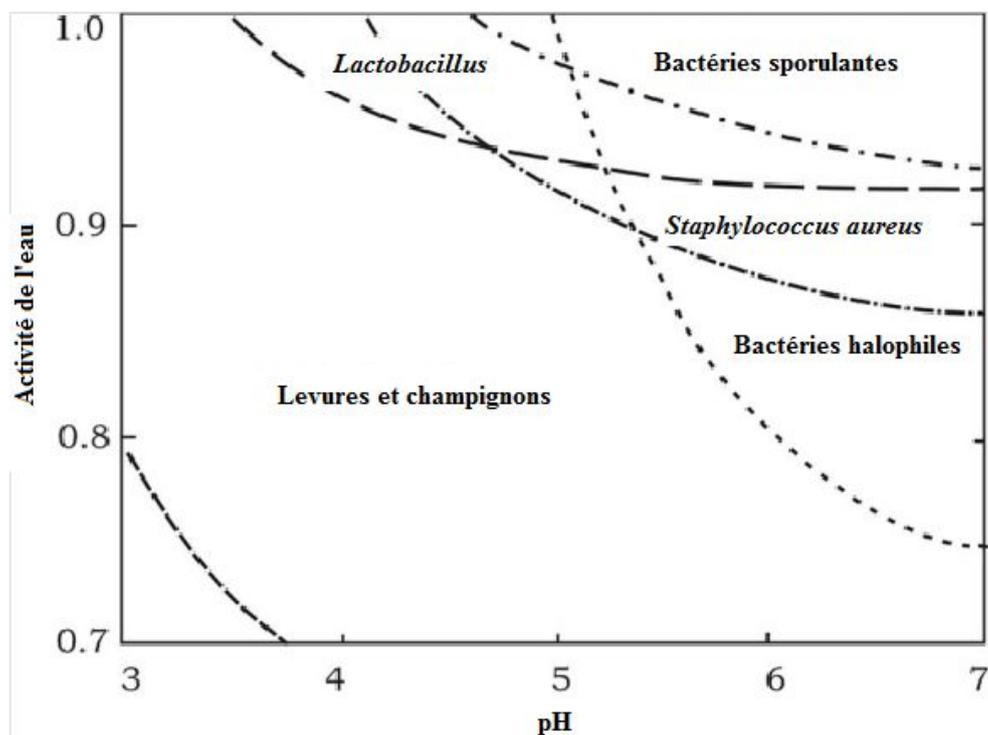
## **1.2- Facteurs chimiques affectant la croissance fongique**

### **1.2.1- Le pH**

Le pH est une mesure de l'activité des ions hydrogène dans une solution. En général, les différents groupes microbiens ont un pH de préférence caractéristique. Chaque espèce se

## Synthèse bibliographique

développe dans une gamme définie de pH et a un pH optimum de croissance. Son action sur le développement microbien se situe surtout au niveau de la cinétique des réactions enzymatiques. La plupart des micromycètes préfèrent un environnement légèrement acide, leur croissance étant normalement optimale entre 5 et 6. Leur tolérance est importante vis-à-vis du pH (**figure 9**) (Pitt & Hocking, 1997). Elles se multiplient souvent dans une gamme étendue de pH allant de 3 à 8, mais variable selon les espèces (**Figure 9**). Il y a cependant des limites à leur tolérance et les variations drastiques du pH peuvent les endommager. **La figure 9** montre une représentation de l'influence combinée de l' $a_w$  et du pH sur la croissance des microorganismes.



**Figure 9 : Diagramme montrant l'influence combinée de l'activité d'eau et du pH sur la croissance microbienne (Pitt & Hocking, 1997)**

### 1.2.2- Composition chimique du substrat

La nature du substrat joue un rôle primordial dans la croissance fongique. Dans le cas des céréales par exemple, c'est presque toujours au niveau du germe du grain que se manifeste l'attaque par les moisissures.

## *Synthèse bibliographique*

### **1.3- Facteurs biologiques affectant la croissance fongique**

#### **1.3.1- Intéraction microbienne**

La compétition pour les nutriments et l'espace est un phénomène rencontré fréquemment dans le monde vivant. La présence simultanée de plusieurs espèces de microorganismes dans le même milieu détermine les interactions entre les différentes espèces. La synthèse des mycotoxines et leur accumulation dans le milieu peut aussi avoir un effet inhibiteur sur le développement de certaines espèces microbiennes (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

#### **1.3.2- Présence d'insectes**

Les insectes représentent les principaux vecteurs des spores des moisissures. Ils contribuent à l'infestation des denrées par les moisissures aussi bien dans le champ que dans les locaux de stockage (Pfohl-Leszkowicz, 2001). En dégradant la paroi des grains et des graines, les insectes favorisant la contamination par les moisissures. Ces dernières envahissent les graines cassées ou fissurées qui constituent des foyers favorables pour le développement et la production des mycotoxines. Par exemple, la contamination d'arachides avec *Aspergillus flavus* avant la récolte est souvent associée à l'attaque d'insectes (Pfohl-Leszkowicz, 2001). Les acariens sont aussi des vecteurs importants de spores, ils vivent sur les grains moisissus, récupèrent et transportent ensuite les spores sur la surface de leur corps et dans leur tube digestif (Castegnaro & Pfohl-Leszkowicz, 2002). De même, les chenilles et les coléoptères sont souvent associés avec la contamination du maïs par les aflatoxines (Hubert et al., 2007). Pendant le stockage de céréales, les oiseaux et les rongeurs peuvent avoir le même rôle de vecteurs de spores fongiques (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

## **2- La mycotoxinogénèse**

La mycotoxinogénèse est définie comme étant l'ensemble de facteurs de synthèse et d'excrétion des mycotoxines. La production des mycotoxines est directement liée à la croissance fongique. Par conséquent, les facteurs capables d'influencer la croissance fongique vont aussi jouer un rôle sur la toxinogénèse. D'une manière générale, les conditions environnementales nécessaires à la production de mycotoxines sont plus étroites que celles permettant la croissance fongique et sont, le plus souvent, proches des conditions optimales de développement de l'espèce considérée. Le type de mycotoxines contaminant les aliments et la quantité produite dépendent de tous ces éléments mais aussi de la stabilité des toxines dans le milieu alimentaire. En plus des facteurs environnementaux ou extrinsèques, la sécrétion de

## *Synthèse bibliographique*

métabolites secondaires par les souches fongiques toxigènes dans les aliments dépend également d'autres facteurs liés à la nature de la souche, dis intrinsèques. Ainsi, la production de mycotoxines est une conséquence combinée des propriétés génétiques de la souche et des facteurs environnementaux (Olsen et al., 2003 ; Blumenthal, 2004).

### **2.1- Facteurs intrinsèques de la mycotoxinogénèse**

Les mycotoxines sont essentiellement élaborées par des espèces appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium* *Penicillium* et *Alternaria*. La dissémination des mycotoxines dépend du potentiel infectieux des moisissures (intensité de sporulation, longévité des spores).

Un aliment moisie n'est pas forcément contaminé par les mycotoxines car les champignons ne sont pas tous toxigènes. Toutefois, il n'existe pas de relation directe entre espèce fongique et mycotoxine. En effet, une même molécule peut-être produite par plusieurs espèces fongiques appartenant à des genres différents. Par exemple, l'ochratoxine A (OTA) est produite par *Penicillium nordicum*, *P. verrucosum* (Olsen et al, 2003), *Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe et al., 1965), *Aspergillus niger* (Abarca et al., 1994) et *Aspergillus carbonarius* (Horie, 1995). Parmi les espèces réputées toxigènes, toutes les souches n'ont pas forcément la capacité à produire la (les) mycotoxine(s), c'est-à-dire que certaines souches sont fortement productrices de toxines alors que d'autres le sont mais à des degrés moindre ou bien non toxigènes (Castegnaro & Pfohl-Leszkowicz, 2002). De même, une espèce peut élaborer plusieurs mycotoxines comme par exemple *Aspergillus flavus* qui peut produire entre autre les aflatoxines, l'acide cyclopiazonique et l'aspertoxine. Cependant, certaines mycotoxines sont étroitement liées à certaines espèces fongiques : aflatoxines (*A. flavus* et *A. parasiticus*), sporidesmines (*Pithomyces chartarum*) (Fitzgerald et al., 1998). La toxino-génèse d'un champignon ainsi que la quantité produite dépendent de la souche (polymorphisme génétique) et du stade de développement de la mycète (Blumenthal, 2004).

### **2.2- Facteurs extrinsèques de la mycotoxinogénèse**

Les facteurs extrinsèques ou environnementaux affectant la production de mycotoxines sont d'origine chimique, physique, physico-chimique ou biologique (Mitchell et al., 2004). Cependant, ces facteurs agissent rarement d'une façon indépendante (Lacey, 1986) et leurs interactions sont habituellement plus importantes que l'effet d'un facteur simple.

## *Synthèse bibliographique*

### **2.2.1- Facteurs physiques, physico-chimiques et chimiques affectant la production des mycotoxines**

#### **2.2.1.1- Activité de l'eau**

L'activité hydrique nécessaire à la toxino-génèse est supérieure à celle permettant la croissance fongique (Pfohl-Leszkowicz, 2001). Par exemple, *Penicillium verrucosum* peut se développer à partir d'une  $a_w$  de 0,80 ; par contre, la production d'OTA n'est possible que lorsque l' $a_w$  est supérieure ou égale à 0,85 (Cairns-Fuller et al., 2005). La formation des aflatoxines par *Aspergillus flavus* nécessite une valeur d' $a_w$  comprise entre 0,83 et 0,87 mais la croissance du microorganisme peut avoir lieu à des valeurs d' $a_w$  plus basses (Troller, 1980). En étudiant, la production de l'AFB1 dans les arachides, Diener et Davis (1967) ont rapporté que la valeur optimale pour la production d'AFs est 0,95  $a_w$ , alors qu'aucune quantité d'AFs n'a été détectée à 0,85  $a_w$ . En 1969, Hunter a montré que la valeur minimale permettant la production des AFs est égale à 0,84  $a_w$ . Les quantités maximales d'OTA, produites par *A. ochraceus* dans l'orge, ont été observées à 0,98  $a_w$  (Ramos et al., 1998). La production de la fumonisine B1 par *F. moniliforme* et *F. proliferatum* dans le maïs est maximale à 0,97  $a_w$  (Marin et al., 1999a,b).

#### **2.2.1.2- Le pH**

Comme pour l' $a_w$ , la gamme de pH permettant la toxino-génèse est plus restreinte que celle permettant la croissance fongique. En effet, Keller et al. (1997) ont démontré que la production de fumonisine B1 est maximale à un pH compris entre 3,7 et 4,2.

#### **2.2.1.3- Présence d'oxygène**

Généralement, la production de mycotoxines est plus sensible à la variation de la composition de l'air que la croissance fongique. La réduction de la pression partielle en oxygène jusqu'à moins de 1% et l'accroissement des concentrations de CO<sub>2</sub> empêchent l'élaboration des mycotoxines (Keller et al., 1997 ; Cairns-Fuller et al., 2005). Par contre, *F. roseum*, dans une atmosphère confinée, peut encore élaborer de la zéaralénone. Après conservation dans une atmosphère confinée, dans laquelle les moisissures peuvent plus ou moins se développer, la remise à l'air libre ou la ventilation provoque rapidement une intense toxino-génèse.

## Synthèse bibliographique

### 2.2.1.4- Température

La température optimale pour l'élaboration des mycotoxines est généralement proche de la température optimale de croissance, mais, le plus souvent, légèrement inférieure. C'est le cas des aflatoxines élaborées par *Aspergillus flavus* (Pfohl-Leszkowicz, 2001). En étudiant l'effet d'une large gamme de température (2-52°C), Schindler et al. (1967) ont constaté que la production d'aflatoxines est maximale à 24°C. Ces auteurs ont démontré que la sécrétion des aflatoxines n'est pas liée au taux de croissance d'*A. flavus* et n'est pas détectée à des températures inférieures à 18°C ou supérieures à 35°C. Une production optimale d'aflatoxines a été signalée à une gamme de température allant de 20 à 35°C pour des isolats d'*A. flavus* et *A. parasiticus* cultivés sur différents substrats tels que le coton, les arachides décortiquées et le riz (Schroeder & Hein, 1967). La température optimale pour la production d'OTA par *A. ochraceus* est comprise entre 25 et 30°C (Ramos et al., 1998). Parfois, l'apparition des mycotoxines dans des conditions naturelles est favorisée par des températures relativement basses par rapport à celles favorisant une croissance optimale de l'espèce fongique. La température optimale pour la croissance de *Fusarium graminearum* et *Fusarium roseum* est de 25°C, mais la synthèse de la zéaralène peut avoir lieu à 15°C. La température optimale pour la production de fumonisine B1 dans le maïs est 30°C pour *F. moniliforme* et 15°C pour *F. proliferatum* (Marin et al., 1999a,b). Dans certains cas, l'apparition des mycotoxines dans les conditions naturelles est favorisée à des températures basses, au voisinage de la température minimale de croissance : de l'ordre de 1 à 4°C pour les trichothécènes par *F. tricinctum* (Pfohl-Leszkowicz, 1999). La température peut aussi influencer la proportion de toxines produites par une souche susceptible de synthétiser plusieurs molécules. Par exemple, *Fusarium graminearum* peut produire préférentiellement de la zéaralène à 25°C, alors que c'est le déoxynivalenol qui sera majoritairement produit à 28°C (Pfohl-Leszkowicz, 2001). Dans le cas des Aspergilli noirs, la production de l'OTA se produit dans un large intervalle de température ce qui explique la présence de cette mycotoxine chez les vignobles à tous les stades de développement de la plante (Esteban et al., 2004). En effet, la température optimale pour la production d'une mycotoxine donnée par une espèce fongique quelconque dépend des caractéristiques de la souche et des propriétés du substrat (Klich, 2007). Avec les changements climatiques que le monde a connus pendant ces dernières années, l'apparition des aflatoxines dans les régions où leur incidence était rare peut devenir plus fréquente. A titre d'exemple, de récentes apparitions d'aflatoxines dans les aliments ont été signalées dans

## *Synthèse bibliographique*

certaines régions de l'Europe en raison de la période de sécheresse prolongée (Miraglia et al., 2009).

### **2.2.1.5- Composition du substrat**

La composition qualitative et quantitative des substances nutritives (surtout les glucides, principale source de carbone chez les moisissures) peut influencer la production des mycotoxines. La présence de quelques substances dans les aliments, comme le saccharose et les acides aminés, stimule la croissance fongique ainsi que l'élaboration des mycotoxines. La contamination d'une denrée alimentaire par les moisissures dépend de la nature du substrat en particulier de la nature des glucides disponibles. La présence de certaines molécules dans le substrat peut aussi influencer la production des mycotoxines. Ainsi, l'acide phytique diminue la synthèse d'aflatoxine par *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus* alors que la proline stimule cette production (Pfohl-Leskowicz, 2001). *P. verrucosum* est le producteur principal d'OTA dans les céréales tandis que *P. nordicum* contamine souvent les produits riches en protéines, les produits fermentés à base de viandes et fromages (Lund & Frisvard, 2003). De même, la proline et l'acide glutamique stimulent la synthèse d'OTA par *A. alutaceus* et *P. verrucosum*. Il y a une proportionnalité entre le taux de protéines contenues dans l'orge et l'apparition d'OTA (Pfohl-Leskowicz, 1999). Concernant les fumonisines, l'amylopectine (Bluhm & Woloshuk, 2005) et le fructose (Jimenez et al., 2003) semblent être les meilleures sources de carbone stimulant la production de cette mycotoxine chez les *Fusarium*.

### **2.2.2- Facteurs biologiques affectant la production des mycotoxines : interactions microbiennes**

La présence simultanée de plusieurs espèces de microorganismes dans le même milieu entraîne une diminution de la production de mycotoxines par chacun des microorganismes producteurs. Ainsi, la quantité d'aflatoxine B1 produite est réduite quand une souche d'*Aspergillus flavus* est introduite dans une culture en même temps qu'une souche d'*Aspergillus parasiticus*, et ce, même si la souche d'*Aspergillus parasiticus* est une souche non toxigène (Pfohl-Leskowicz, 2001). De même, la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* est inhibée par la présence d'*Aspergillus niger* (Horn & Wicklow, 1983). En 1988, Mislivec a démontré expérimentalement que la culture simultanée d'*Aspergillus parasiticus* et d'*Aspergillus flavus* ne modifie pas la production d'aflatoxines par ce dernier, alors que la présence d'espèces de *Penicillium* diminue la production de cette mycotoxine

## *Synthèse bibliographique*

(Mislivec et al., 1988). La présence de *Fusarium verticillioides* sur les épis protège le maïs d'une contamination ultérieure avec *Aspergillus flavus* et réduit la quantité d'aflatoxine produite (Zummo & Scott, 1992).

La connaissance de la physiologie des moisissures et des facteurs influant l'accumulation des mycotoxines dans les aliments implique le développement des stratégies de prévention, de décontamination et la conception des modèles de prédiction de la croissance fongique et la production des mycotoxines.

### **IV- Procédés de prévention, de minimisation et de prédiction de la contamination par les mycotoxines**

#### **1- Procédés de prévention et de minimisation des mycotoxines au cours et après la récolte**

Les origines de la contamination des plantes par les moisissures et leurs mycotoxines sont multiples. Ainsi, toute stratégie de prévention de la contamination fongique doit être appliquée tout au long de la chaîne alimentaire. Trois étapes d'intervention ont été identifiées. La première consiste à éviter l'infestation par les champignons, la deuxième doit avoir lieu au cours de l'invasion des végétaux par les mycètes et la production des mycotoxines et la troisième est réalisée lorsque les produits agricoles s'avèrent contaminés par les mycotoxines (Jouany, 2007). Au cours de cette partie, on va s'intéresser seulement aux stratégies appliquées au cours de la récolte et au stockage et puisque il n'y a pas de données sur le sorgho, les mesures citées par la suite ont été déterminées par des travaux réalisés sur d'autres céréales comme le blé et le maïs.

##### **1.1- Stade physiologique des plantes**

Le choix du moment de récolte peut avoir des conséquences sur le niveau final de mycotoxines. Généralement, la récolte précoce donne des faibles concentrations en mycotoxines (Jones et al., 1981). Le risque de contamination par les fumonisines peut commencer très tôt au cours du développement de l'épi et la production de la mycotoxine augmente au cours de la maturation de l'épi infesté. Selon Le Bars et al. (1994) et Cahagnier et al. (1995), la production de FB1 par *Fusarium moniliforme* dans les grains de maïs peut continuer après la récolte avant le séchage, en particulier dans la période de pré-stockage lorsque les grains fraîchement récoltés sont encore humides.

##### **1.2- Contrôle du niveau d'humidité avant et pendant le stockage**

La teneur totale en eau est un facteur limitant pour la croissance et l'activité fongique. Une  $a_w$  supérieure à 0,65 est nécessaire pour le métabolisme fongique. Un niveau total d'eau supérieur à 150 g/kg est suffisant pour que les champignons restent vivants bien que de grandes différences existent entre les espèces fongiques. *Aspergillus* spp., qui est le champignon le moins exigeant, peut se développer dans un niveau bas d'humidité (de 13,5 à 18%), tandis que *Fusarium* spp. a besoin d'une humidité de 17% à 19%. Selon Birzele et al.

## *Synthèse bibliographique*

(2000), la concentration de DON augmente de manière significative si le taux d'humidité dépasse 17-20% d'eau à 20°C. Puisque l'humidité atmosphérique varie considérablement durant la journée, le choix du moment de la récolte pendant la journée est un facteur essentiel qui détermine le niveau de contamination par le *Fusarium* après la récolte. En cas d'un taux d'humidité supérieur à 140 g/kg au stade post-récolte, une étape de séchage est absolument nécessaire avant le stockage. Ono et al. (2002) ont suivi tout les deux mois l'effet de deux teneurs en eau (110 et 140 g/kg) sur la flore fongique et la contamination par les mycotoxines dans le maïs pendant 12 mois de stockage. *Fusarium* spp. et les fumonisines ont été détecté dans le maïs fraîchement récolté et leur contenu n'a pas changé au cours des 12 mois d'entreposage. Les auteurs ont conclu que la valeur de l'humidité au stade de récolte détermine la mycoflora finale et la teneur en fumonisines dans le maïs.

### **1.3- Contrôle de la température pendant le stockage**

Outre l'humidité, la température régnant au cours du stockage affecte la croissance et l'activité fongiques. L'accumulation des grains dans le silo immobilise de grands volumes d'air, ce qui représente un bon isolant thermique. La température au centre du silo reste proche de celle de la récolte, alors que les grains en contact avec les parois se refroidissent lorsque la température externe diminue. Par conséquent, des taches d'humidité se produisent dans le silo favorisant la prolifération des champignons. Des capteurs de températures distribués à différentes hauteurs dans le silo détectent tout changement de température et par la suite toute activité microbienne. Ainsi, des opérations de refroidissement couplées à des systèmes de ventilation doivent être installés dans le silo pour éviter toute aggravation de l'activité fongique. En outre, la rotation des grains de temps à l'autre peut diminuer la présence des taches d'humidité à l'intérieur du silo (Jouany, 2007).

### **1.4- Traitements physiques des grains contaminés**

#### **1.4.1- Suppression des grains endommagés**

Les grains de maïs fissurés ou endommagés mécaniquement contiennent généralement des niveaux de fumonisines environ 10 fois plus que les grains intacts. Le nettoyage de la surface externe des grains et l'élimination des grains endommagés sont des moyens complémentaires pour réduire l'infestation des grains sains par les grains contaminés (Balzer et al., 2004). La suppression des grains endommagés a permis de diminuer le taux de DON et de ZEN dans le maïs et le blé (Jackson & Bullerman, 1999). Une diminution de 60% de FB1

## *Synthèse bibliographique*

et FB2 a été obtenue après l'application des techniques de tri et de dépistage des grains de maïs (Malone et al., 1998).

### **1.4.2- Lavage**

Le lavage des grains avec l'eau de robinet sous pression peut réduire la teneur en mycotoxines (Wilson et al., 2004). Ce traitement peut être appliqué pour les aliments destinés à la consommation humaine et animale (Fandohan et al., 2005). Par ailleurs, le coût de séchage des grains après lavage limite l'application de cette technique.

### **1.4.3- Décorticage des grains**

La suppression de la partie externe du noyau réduit de 34% les niveaux du DON et du ZEN (House et al., 2003 ; Fandohan et al., 2005). L'efficacité du procédé du décorticage dépend de la pénétration des moisissures dans les grains.

### **1.4.4- Traitement thermique**

La plupart des mycotoxines sont thermostables. Cependant, plusieurs études ont montré que la concentration de quelques mycotoxines peut diminuer sous l'effet de la chaleur. Dupuy et al. (1993) ont montré que le contenu en FB1 suit une cinétique de décomposition du premier degré en fonction de l'augmentation de température. Le taux de détoxification de la FB1 et FB2 dépasse les 70% dans la farine de maïs après un chauffage à 190°C pendant 60 min, alors qu'il atteint 100% lors d'un chauffage de 220°C pendant 25 min (Scott & Lawrence, 1994). Le processus de destruction des fumonisines au cours de la fabrication des corn flakes à partir du maïs contaminé par addition directe ou par culture du *Fusarium proliferatum* dans les grains a été étudié par Castelo et Bullerman (2001). Ces auteurs ont montré que 35% et 53% de la FB1 ont été perdus respectivement à la fin du processus. En outre, le contenu en ZEN dans le maïs contaminé artificiellement est réduit de 66 à 83% après extrusion à des températures allant de 120 à 160°C, tandis que des réductions plus faibles ont été observées dans le cas du DON et de moniliformine (Castells et al., 2005). Cependant, la disparition des fumonisines et de ZEN après cuisson des aliments est un phénomène qui est encore non expliqué. La diminution observée de ces mycotoxines peut être due à une interaction avec la matrice alimentaire entraînant des difficultés de l'analyse des toxines. La liaison des mycotoxines aux protéines et aux sucres peut réduire leur biodisponibilité dans le

## *Synthèse bibliographique*

tractus gastro-intestinal et expliquer l'inactivation partielle de leur toxicité potentielle (Humpf & Voss, 2004).

### **1.4.5- L'irradiation**

L'irradiation Gamma a été testée pour réduire la contamination des grains ou des aliments destinés à l'alimentation humaine et animale par les spores ou pour dégrader les mycotoxines déjà produites dans les aliments (Frank & Grunewald, 1970). L'irradiation Gamma à 5 kGray inhibe la croissance des *Fusarium* spp. et la formation des mycotoxines dans les grains (Aziz & Moussa, 2004). L'irradiation par faisceau d'électrons de l'orge contaminé par du *Fusarium* réduit l'infection fongique à des doses supérieures à 4 kGray (Kottapalli et al., 2003). Ritieni et al. (1999) ont montré que l'irradiation UV n'a aucun effet sur la fusaproliférine, une mycotoxine produite par des espèces phytopatogènes de *Fusarium*. Ainsi, l'irradiation par UV peut être utilisée pour éliminer les spores des moisissures et non pas pour éliminer les mycotoxines des aliments contaminés (Jouany, 2007).

### **1.5- Traitements chimiques**

L'usage de l'hydroxyde d'ammonium ou l'ammoniac gazeux est une procédure efficace pour réduire les aflatoxines dans les aliments des animaux. Appliqué au maïs contaminé par les fumonisines pendant 4 jours à 50°C et sous pression atmosphérique, l'ammoniac a diminué de 30 à 45% le contenu de FB1 mais n'a pas changé la toxicité chez les rats (Norred et al., 1991). Le trempage des grains de maïs dans l'eau contenant du  $\text{Ca(OH)}_2$ , n'est pas réellement efficace car il hydrolyse la FB1 qui reste toujours toxique (Park et al., 1996a). La combinaison d'un traitement thermique avec  $\text{NaHCO}_3$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  seul ou avec du  $\text{Ca(OH)}_2$  permet de réduire à 100% la FB1 dans le maïs contaminé (Park et al., 1996a). Le traitement du maïs contaminé avec des solutions de bisulfites de sodium à 80°C et pendant 18 heures peut convertir 85% du DON à un DON conjugué au sulfonate qui semble être non toxique aux porcs (Young et al., 1987). D'autres traitements chimiques avec l'acide chlorhydrique, le peroxyde d'hydrogène, l'hypochlorite de sodium, l'acide ascorbique et le carbonate d'ammonium, n'ont pas démontré une efficacité contre le DON.

### **1.6- Usage des adsorbants**

De nombreuses études ont été menées au cours de ces dernières années sur les adsorbants organiques et, plus récemment, des adsorbants inorganiques. Ils peuvent être

## *Synthèse bibliographique*

recommandés lorsque toutes les règles de prévention ont échoué et, par conséquent, les aliments sont probablement contaminés par les mycotoxines. Cependant, il faut souligner qu'en Europe, ces additifs ne sont pas autorisés jusqu'à ce jour. Les argiles sont des adsorbants naturels constituées de silicates ou des aluminosilicates. Elles comprennent une large gamme de produits tel que le bentonite et le zéolite. Ce sont des composés inorganiques poreux constitués de molécules de silice chargées positivement et entourées par des atomes d'oxygènes chargés négativement. Les mycotoxines peuvent être absorbées par ces structures poreuses et piégées par les charges électriques (Jouany, 2007).

La majorité des adsorbants est reconnue comme étant des liants efficaces des aflatoxines (Phillips et al., 1991, 1994 ; Smith et al., 1994) lorsqu'ils sont ajoutés à une concentration de 10 g/kg. Toutefois, leur efficacité contre les fusariotoxines tel que la zéaralénone, les fumonisines et les trichothécènes est très limitée et presque nulle (Huwig et al., 2001). Le bentonite peut absorber la toxine T-2, mais son taux d'incorporation dans l'alimentation doit être 100 g/kg c'est-à-dire 10 fois plus que le niveau efficace pour les aflatoxines (Carson & Smith, 1983 ; Smith & Carson, 1984). Comme la majorité des argiles, les phyllosilicates tel que le kaoline et le spéolite ne sont pas efficaces contre les mycotoxines autres que les aflatoxines (Masimango et al., 1979 ; Schell et al., 1993).

### **1.7- Traitements biologiques**

Les méthodes physiques et chimiques développées pour prévenir l'envahissement par les champignons ou la réduction des mycotoxines sont parfois peu efficaces et limitées à cause de plusieurs obstacles tels que le coût onéreux de ces méthodes et la dégradation ou l'inactivation partielle des mycotoxines. En outre, certaines moisissures ont acquis une résistance aux traitements chimiques et certains agents de conservation. Ainsi, certains *Penicillium* peuvent se développer en présence de potassium de sorbate (Davidson, 2001) alors que d'autres champignons possèdent la capacité de dégrader le sorbate (Nielsen & de Boer, 2000). Par conséquent, la biopréservation ou le contrôle d'un organisme par un autre a reçu beaucoup d'attention au cours des dernières années (Magnusson et al., 2003). Le groupe 12-13 époxyde, par exemple, est responsable de la toxicité des trichothécènes. Ainsi, la réaction de dépoxydation par la flore ruminale et intestinale (He et al., 1992 ; Kollarczik et al., 1994) ou par une nouvelle souche d'*Eubacterium* isolée du rumen des bovins par Blinder et al. (2000) entraîne une perte significative de la toxicité. Des enzymes capables de dégrader les fumonisines ont été isolées à partir d'un champignon filamenteux saprobe infestant le maïs, et

## *Synthèse bibliographique*

les gènes correspondants ont été clonés et transférés au maïs transgénique (Blackwell et al., 1999 ; Duvik, 2001).

Parmi les antagonistes biologiques naturels, les bactéries lactiques ont plusieurs possibilités d'application (Dalié et al., 2010). Ces microorganismes, qui font partie de la flore intestinale, sont largement utilisés dans l'industrie agro-alimentaire pour la production des aliments fermentés. Les bactéries lactiques produisent plusieurs antagonistes capables de contrôler les bactéries pathogènes et la flore de détérioration. L'utilisation des bactéries lactiques pour contrôler les moisissures peut être une alternative intéressante aux méthodes physiques et chimiques pour leurs propriétés antimicrobiennes importantes (Dalié et al., 2010).

Selon Magnusson et al. (2003), trois mécanismes peuvent expliquer l'efficacité antimicrobienne des bactéries lactiques : l'effet des acides organiques, la compétition sur les nutriments avec les autres microorganismes et la production des composés antagonistes. Plusieurs composés ayant une forte activité anti-fongique ont été isolés à partir des cultures bactériennes. La majorité de ces composés sont des métabolites de faible poids moléculaire incluant : des acides organiques, des composés phénoliques, des bactériocines (nisine, reutéline), du peroxyde d'hydrogène, des acides gras ect...

Cette nouvelle approche microbienne aura probablement ses limites pour les raisons suivantes : la grande spécificité des enzymes n'est pas adaptée à la grande variabilité des contaminants potentiels, la concentration des enzymes et les conditions de leurs activités doivent être optimales car le temps de réaction dans le tube digestif est plutôt court, de plus les métabolites doivent être moins toxiques que la toxine native (Dalié et al., 2010).

### **1.7.1- Les acides organiques**

Les acides lactiques et acétiques sont les principaux produits de fermentation des glucides par les bactéries lactiques. Ces métabolites sont généralement reconnus comme des agents de conservation des aliments. Ils diffusent à travers la membrane plasmique des autres microorganismes et se dissocient ensuite en libérant les ions hydrogène et provoquant ainsi la chute du pH. En plus, les acides organiques neutralisent le potentiel électrochimique des protons et augmentent la perméabilité de la membrane plasmique d'où l'effet bactériostatique et parfois bactéricide (Batish et al., 1997). L'acide acétique a été décrit comme plus efficace que l'acide lactique et constitue un inhibiteur de la croissance des moisissures (Batish et al., 1997). D'autres acides organiques qui présentent une activité anti-fongique ont été identifiés

## *Synthèse bibliographique*

tel que l'acide phényllactique. Ce composé a été isolé pour la première fois d'un extrait de *Lactobacillus plantarum* (Lavermicocca et al., 2000), et il est capable d'inhiber la croissance de quelques souches de *P. expansum*, *A. niger*, *A. flavus* et *F. graminearum* (Lavermicocca et al., 2000).

### **1.7.2- Les composés phénoliques**

Un seul composé phénolique synthétisé par une bactérie lactique est connu. Il s'agit d'un composé phénolique avec un noyau aromatique produit par *Pediococcus acidilactici* doté d'une activité fongique contre plusieurs moisissures (Mandal et al., 2007).

### **1.7.3- Les acides gras hydroxylés**

Certaines bactéries lactiques peuvent produire des acides gras antimicrobiens qui améliorent la qualité sensorielle des produits fermentés. L'acide caproïque agit en synergie avec d'autres acides comme l'acide propionique, butyrique et valérique (Corsetti et al., 1998). Les acides gras hydroxylés présentent un large spectre d'inhibition et sont efficaces contre les moisissures et les levures. La concentration inhibitrice minimale se situe entre 10 et 100 µg/ml (Sjögren et al., 2003).

### **1.7.4- Le peroxyde d'hydrogène**

Le peroxyde d'hydrogène est produit par les bactéries lactiques en présence d'oxygène (Kandler, 1983). Incapables de synthétiser la catalase, ces bactéries ne peuvent dégrader ce métabolite. En s'accumulant dans les cellules, le peroxyde d'hydrogène oxyde la membrane lipidique et les protéines cellulaires (Lindgren & Dobrogosz, 1990). La croissance de *P. expansum* est inhibée en présence de peroxyde d'hydrogène à 5% (Venturini et al., 2002). Ces auteurs ont suggéré que l'application de petites quantités de peroxyde d'hydrogène sur les pommes peut être une alternative aux fongicides pour inhiber le *P. expansum*.

### **1.7.5- La reutérine**

La reutérine est un produit de fermentation du glycérol par quelques espèces de *Lactobacillus* dans des conditions anaérobies. La reutérine est capable d'inhiber la croissance du genre *Aspergillus* et *Fusarium* (Chung et al., 1989). L'addition du glycérol à certaines cultures de bactéries lactiques qui produisent la reutérine augmente leur activité antifongique (Magnusson, 2003).

## *Synthèse bibliographique*

### **1.7.6- Peptides antifongiques**

Il n'y a aucune preuve claire sur le rôle des peptides bactériens dans l'inhibition de la croissance des moisissures. Cependant, certains auteurs ont signalé que plusieurs bactéries produisent des métabolites antifongiques sensibles aux enzymes protéolytiques. Par exemple, l'activité antifongique de *Lactobacillus* subsp *casei pseudoplantarum* a été supprimée par une trypsine (Gourama & Bullerman, 1997). Après une caractérisation partielle, les mêmes auteurs ont suggéré que la substance à activité antifongique est un peptide de faible poids moléculaire (1 KDa).

### **2- Etablissement d'un plan HACCP**

Le système HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) est une approche préventive, structurée et systématique qui a pour but le contrôle de la sécurité sanitaire des aliments. Le système HACCP est un élément clé dans la gestion de la qualité qui nécessite une bonne compréhension de la relation cause-effet. Il repose sur l'établissement des systèmes de gestion de qualité tels que les bonnes pratiques de fabrication, les bonnes pratiques d'hygiène, les bonnes pratiques agricoles et les bonnes pratiques de stockage. Les organismes de réglementations ont reconnu l'utilité de ce concept et il a été incorporé dans les exigences législatives de l'EU (the General Hygiene regulations for managing food safety (Regulation (EC) n° 178/200)). Le concept du HACCP n'est pas une norme et il varie d'un produit alimentaire à un autre. La mise en œuvre d'un système HACCP doit inclure toutes les étapes de production de la ferme jusqu'à l'assiette et impliquer la gestion des risques à toutes ces étapes pour assurer la salubrité de la denrée (Regulation (EC) n° 178/200).

Le Codex Alimentarius (*CAC/RCP 1-1969 Rev 4-2003*) a défini sept principes pour établir un plan HACCP, qui sont :

- Principe 1 : Analyse des risques (identifier les dangers et évaluer les risques qui leurs sont associés à chaque étape de la filière)
- Principe 2 : Détermination des points critiques de contrôle (CCP) (déterminer les étapes où un contrôle doit être appliqué pour éliminer ou minimiser un danger)
- Principe 3 : Fixation des limites critiques pour tous les CCP au-delà desquelles des corrections doivent être appliquées
- Principe 4 : Mise en place d'un système de surveillance pour vérifier que les étapes ne dépassent pas les limites fixées

## *Synthèse bibliographique*

- Principe 5 : Etablissement d'une procédure de correction lorsque la surveillance des CCP montre une déviation par rapport aux limites critiques fixées

- Principe 6 : Etablissement des procédures de vérification (l'audit par exemple) pour confirmer l'efficacité du plan HACCP

- Principe 7 : Etablissement d'une documentation concernant toutes les procédures relatives à tous ces principes et leur application

Ainsi, l'établissement d'un plan HACCP pour prévenir la contamination des aliments par les mycotoxines nécessite la détermination de la nature des mycotoxines qui peuvent survenir dans l'aliment à produire, définir les conditions qui permettent la production de cette mycotoxine, définir les CCP ou les étapes de production au cours desquelles une surveillance des mycotoxines et des moisissures doit être effectuée (contamination pré ou post-récolte), définir les sources de contamination (air, machines...), fixer les limites critiques surtout pour l'humidité (la teneur en eau de la matière première et du produit à toutes les étapes de la fabrication) et la température, définir les actions correctrices si les limites fixées s'avèrent dépassées (séchage, ventilation, lutte contre les insectes, irradiation aux UV...).

### **3- Modèles de prédiction**

La nécessité d'assurer la qualité microbiologique et la sécurité sanitaire des produits alimentaires a stimulé l'intérêt pour l'utilisation des modèles mathématiques pour quantifier et prédire le comportement microbien (Lahlali et al., 2005). Depuis une vingtaine d'années, la microbiologie prédictive a été développée pour prédire la présence des agents pathogènes d'origine alimentaire (Dantigny et al., 2005). Bien que les modèles ont été conçus pour les bactéries, récemment un nombre croissant d'études, traitant de l'approche de modélisations prédictives des champignons filamenteux, a été réalisé (Patriarca et al., 2001 ; Parra & Magan, 2004). L'application de la microbiologie prédictive dans le cas des champignons filamenteux n'a pas reçu la même attention que celle des bactéries. Ceci est peut être expliqué par les complexités inhérentes liées à la quantification de la croissance fongique (Gibson & Hocking, 1997). Tandis que les bactéries se reproduisent par fission et se développent normalement de manière homogène dans un milieu liquide ou sur les surfaces, les hyphes peuvent pénétrer dans la matrice tridimensionnelle des aliments (Dantigny et al., 2005). Les bactéries forment des cellules individuelles qui peuvent être facilement énumérées, en particulier dans un bouillon liquide. A des densités cellulaires faibles et dans un milieu solide, des unités formant colonies (CFU/ml ou CFU/g) peuvent être quantifiées facilement. La

## *Synthèse bibliographique*

détermination de la croissance bactérienne par comptage des CFU donnent une courbe sigmoïde caractérisée par une phase de latence, une phase exponentielle et une phase stationnaire (Koch, 1975). Cependant, les champignons ne sont pas unicellulaires. Ils forment un mycélium dont le poids, sauf au stade précoce de la croissance, n'augmente pas de façon exponentielle. En outre, il est impossible de diviser le mycélium en cellules individuelles. Par conséquent, la méthode de quantification par CFU (Colony Forming Unit) ne peut être utilisée que pour le dénombrement des spores (Vindeløv & Arneborg, 2002).

La croissance des champignons implique la germination des spores et l'extension des hyphes, pour finalement former un mycélium. La germination des spores peut être considérée comme la principale étape de croissance à étudier, parce qu'un produit est considéré détérioré lorsque une hyphe devient visible. Cependant, peu d'études ont été réalisées sur la cinétique de germination due à la difficulté d'évaluer la longueur du tube germinatif par observation microscopique sans ouvrir les boîtes de Pétri (Magan & Lacey, 1984). En revanche, plusieurs travaux ont été consacrés à la mesure du taux d'extension des hyphes, qui est généralement exprimé par le taux de croissance radiale du mycélium (mm/jour). Ainsi, la mesure du taux d'extension des hyphes, couramment appelée taux de croissance radiale, est la mesure la plus souvent utilisée, mais elle ne représente pas la croissance fongique tridimensionnelle. Elle décrit la croissance linéaire du diamètre des colonies au cours du temps (Gibson & Hocking, 1997).

L'emploi des modèles de prédiction peut être utile dans la prise de décision pour prévenir les risques sur la santé animale et humaine (Prandini et al., 2008). Avec ces modèles, les niveaux finaux de mycètes et de mycotoxines peuvent être déterminés. La mycologie prédictive constitue un outil très important pour l'industrie agro-alimentaire. Membré et Lambert (2008) ont proposé comme applications à la microbiologie prédictive trois groupes d'activités liées à la sécurité sanitaire des aliments :

- Innovation de nouveaux produits : détermination de la durée de vie d'un nouveau produit, le développement d'un nouveau produit ou d'un nouveau procédé, la mise au point d'une nouvelle formulation d'un produit en se basant sur l'évolution des microorganismes.
- Le soutien opérationnel : prédiction de la croissance des germes pathogènes ou d'altération dans un aliment déterminé et établissement des points critiques de contrôle (CCP) en HACCP.

## *Synthèse bibliographique*

- Evaluation des risques : estimation de l'évolution du nombre de microorganismes dans une chaîne de production, évaluation de l'exposition à un agent pathogène et estimation des conséquences de l'altération des aliments sur la sécurité sanitaire et l'économie.

### **3.1- Modèles cinétiques appliqués à la germination, à la croissance et à l'inactivation des moisissures**

De point de vue la sécurité sanitaire, ce sont les mycotoxines qui représentent la cible à modéliser. Cependant, malgré l'absence de corrélation directe entre la croissance fongique et la présence de mycotoxines, la prévention de l'envahissement des aliments par les moisissures conduit à éviter la production des mycotoxines. C'est pour cette raison que les scientifiques ont développé des modèles mathématiques pour la prédiction de la vitesse de la germination ou de l'inactivation des spores et de la croissance des hyphes (Garcia et al., 2009). Le modèle mathématique est une description simplifiée des relations entre les observations ou les réponses du système et les facteurs qui sont censés provoquer les réponses observées. Ainsi, un modèle cinétique décrit un ensemble de données ou représente des hypothèses sur les relations entre des variables indépendantes qui conduisent à des données ou des observations (McMeekin et al., 2008). En microbiologie prédictive, les modèles mathématiques sont utilisés pour prédire la croissance de différents microorganismes et la production des toxines et aussi la réponse de ces microorganismes aux facteurs environnementaux. Les modèles prédictifs microbiologiques peuvent être classifiés en modèles primaires, secondaires et tertiaires.

#### **3.1.1- Modèles primaires appliqués à la germination, à la croissance et à l'inactivation des moisissures**

Les modèles primaires décrivent comment le nombre de microorganismes change au cours du temps sous l'influence de certains facteurs (Marks, 2007). La croissance fongique implique la germination des spores puis la croissance des hyphes qui forment le mycélium. Les modèles utilisés pour les bactéries peuvent être aussi appliqués aux champignons. On peut modéliser la germination, l'inactivation des spores et la croissance radiale.

## *Synthèse bibliographique*

### **3.1.1.1- Modèles appliqués à la germination**

Une spore est considérée germée lorsque le tube germinatif mesure deux fois le diamètre initial de la spore. La germination se produit dans un temps très court. Il y a peu d'études sur la cinétique de germination à cause des difficultés concernant la collection de données reproductibles (Dantigny et al., 2005). L'augmentation du pourcentage des spores germées au fil du temps a été modélisée par Gompertz et par le modèle logistique. La germination ou plutôt le temps nécessaire pour que 50% des spores viables germent est estimé avec une meilleure précision avec le modèle logistique alors que la phase de latence est mieux estimée par l'équation de Gompertz.

### **3.1.1.2- Modèles appliqués à la croissance**

Les modèles cinétiques les plus utilisés sont ceux qui sont basés sur la mesure du diamètre de la colonie qui correspond à la technique la plus simple pour obtenir des données. La croissance des mycètes dans des substrats solides suit généralement un modèle constitué d'une phase de latence et d'une phase de croissance linéaire dans des conditions optimales et en absence de facteurs limitants. Sous des conditions suboptimales, une phase stationnaire peut apparaître lorsque les champignons arrêtent de croître (Gibson et al., 1994), par exemple dans des conditions de limitation de l'activité d'eau. Les modèles de croissance les plus fréquemment utilisés sont le modèle linéaire, l'équation modifiée de Gompertz (Zwietering et al., 1990) et le modèle de Baranyi et Roberts (1994). Le modèle de Baranyi est plus souple et peut être appliqué à la plupart des espèces.

### **3.1.1.3- Modèles appliqués à l'inactivation des spores**

Les populations microbiennes peuvent être soumises à un traitement létal tel que les températures élevées ou l'application d'un agent létal. Peu d'études ont été publiées sur la modélisation de l'inactivation des spores. Ces travaux ont été principalement consacrés aux champignons impliqués dans la détérioration des aliments mais seulement quelques uns comprennent les champignons producteurs de mycotoxines comme par exemple : *Aspergillus niger* (Baggerman & Samson, 1988 ; Fujikawa & Itoh, 1996).

## *Synthèse bibliographique*

### **3.1.2- Modèles secondaires appliqués à la germination, à la croissance et à l'inactivation des moisissures**

Les modèles secondaires décrivent l'influence des facteurs environnementaux sur les principaux paramètres des modèles primaires ; les paramètres de germination et de croissance (taux maximum de croissance par exemple) estimés à partir des modèles primaires sont ensuite modélisés comme une fonction des facteurs intrinsèques et extrinsèques des aliments. Peu d'études ont été réalisées sur l'application des modèles secondaires pour les données de germination, et les modèles polynomiaux ont été les plus utilisés dans ces cas (Halouat & Debevere, 1997). Les modèles les plus utilisés sont : le modèle cardinal de Rosso (Rosso et al., 1993) qui a été plus tard modifié par Rosso et Robinson (2001), le modèle de racine-carrée de Ratkowsky et al., (1983), l'équation linéaire d'Arrhenius-Davey (Davey, 1989), le modèle de Gibson (Gibson et al., 1994) et d'autres modèles polynomiaux.

### **3.1.3- Modèles tertiaires**

La microbiologie prédictive a adopté des méthodes modernes et de nouveaux concepts. Les modèles prédictifs permettent de prédire la réponse des microorganismes en fonction des caractéristiques de l'aliment et des conditions environnementales. La quantité énorme de données acquises permet de développer des modèles mathématiques convenables, d'où la mise en place d'une base de données (Baranyi & Tamplin, 2004). Les modèles tertiaires peuvent être définis en tant qu'une intégration des modèles primaires et secondaires dans une base de données. Une base de données est une collection structurée de données sauvegardée dans une forme électronique dans le but d'assurer une recherche rapide et facile des informations (Brul et al., 2007). Les modèles tertiaires sont adaptés à prédire la croissance de quelques bactéries pathogènes mais ils ne sont pas appliqués à prédire la croissance fongique ou la production de mycotoxines.

## **3.2- Modèles cinétiques appliqués à la production des mycotoxines**

### **3.2.1- Modèles primaires appliqués à la production des mycotoxines**

Pour le moment, il n'y a pas de modèle primaire généralisé associé à la production de mycotoxines. Au cours des dernières années, il y a eu plusieurs publications relatives à la production de différentes mycotoxines dans des milieux synthétiques ou des substrats alimentaires. Ce type d'études quantifie la teneur totale de mycotoxine par poids total de

## *Synthèse bibliographique*

l'échantillon mais elle n'est pas liée au poids du champignon. L'augmentation de la concentration des mycotoxines au cours du temps est le résultat de l'augmentation de la biomasse des champignons plus l'augmentation de la production spécifique des mycotoxines. Une modélisation appropriée devrait permettre l'estimation de la quantité de mycotoxine produite par poids de biomasse fongique et unité de temps. Pitt (1993) a développé certaines équations pour prédire le taux de production et de dégradation de l'aflatoxine par *A. flavus* et *A. parasiticus* en fonction de la croissance fongique et les conditions de l'environnement. Il a supposé que la vitesse de formation de toxine est proportionnelle au taux de croissance et à la biomasse cellulaire.

### **3.2.2- Modèles secondaires appliqués à la production des mycotoxines**

Les études présentant des équations de modélisation secondaire de production de mycotoxines sont très rares. Quelques travaux ont été réalisés sur la détermination de la cinétique de formation de toxines sous l'influence de différents facteurs environnementaux, mais dans certains de ces travaux, les modèles primaires n'ont pas été appliqués. Belli et al. (2004c) ont déterminé le profil du temps nécessaire à la production d'OTA, par des souches d'*Aspergillus* section *Nigri* isolées à partir des raisins et incubées à différentes  $a_w$ , par modélisation des résultats avec la régression linéaire multiple. Plus tard, Marin et al. (2006) ont déterminé la cinétique d'accumulation d'OTA par *A. carbonarius* sur un milieu synthétique à base de raisins en modélisant les résultats avec le modèle sigmoïdale de Gompertz. L'effet de la température sur la production des aflatoxines dans les milieux d'agar a été analysé en utilisant une fonction de température de type Arrhenius (Pitt, 1993). Finalement, Baert et al. (2007) ont modélisé l'accumulation de la patuline dans les pommes ou dans les jus de pommes en fonction de la température et du % d'O<sub>2</sub> pendant le stockage en appliquant une équation polynomiale.

### **Objectifs du travail**

La modélisation de la croissance des mycètes et la production des mycotoxines sous l'influence des facteurs écologiques est une étape primordiale permettant de comprendre la physiologie des ces microorganismes, de prédire les niveaux finaux de contamination par les champignons ou les mycotoxines et de déterminer les conditions de stockage et la durée de conservation. La mycologie prédictive est un outil très utile pour la prise de décision et la mise en place des solutions pertinentes afin de prévenir les risques pour la santé humaine et animale.

Afin d'établir des méthodes de prévention et de minimisation de la contamination des céréales en Tunisie, une détermination de l'occurrence des mycotoxines ainsi que celle des champignons mycotoxinogènes dans le sorgho suivie d'une détermination des profils écophysiologicals des souches toxigènes doivent être réalisées.

Dans le cadre de cette thèse, et afin de répondre à certaines des questions précédemment posées, nous avons réalisé les travaux suivants :

- Etude de l'incidence de l'aflatoxine B1, l'ochratoxine A et la zéaralénone dans le sorgho commercialisé en Tunisie dans la région du Sahel.
- Etude de la composition de la mycobiota (flore fongique) du sorgho et de la capacité de produire les mycotoxines des isolats appartenant aux genres *Fusarium*, *Aspergillus* section *Nigri* et *Aspergillus* section *Flavi*.
- Etude de l'influence des facteurs écologiques essentiellement l'activité de l'eau et la température sur la croissance des moisissures et la production des mycotoxines au cours du temps.

## Deuxième partie : Données expérimentales

---

## **Chapitre I : Inventaire et caractérisation de la mycobiota (flore fongique) du sorgho commercialisé en Tunisie**

### **1- Introduction**

L'importance croissante du sorgho pour l'alimentation humaine et animale dans un grand nombre de pays et le risque de la contamination de cette céréale par des mycotoxines ont conduit la Commission du Codex Alimentarius à demander des études pour obtenir plus de données sur la présence de mycotoxines dans le sorgho. L'objectif principal est d'essayer de minimiser le problème des mycotoxines dans le sorgho dans le monde (Commission du Codex Alimentarius, 2012).

Un certain nombre d'espèces fongiques, appartenant principalement aux genres *Fusarium* (*F. verticillioides*, *F. graminearum*, *F. equiseti*), *Alternaria* (*A. alternata*), *Aspergillus* (*A. flavus*), et *Penicillium* (*P. funiculosum*), *Cladosporium*, *Curvularia*, *Phoma*, envahissent les grains de sorgho et y produisent des mycotoxines (Da Silva et al., 2006 ; Isakeit et al., 2008 ; Alves dos Reis et al., 2010). Ces champignons ont des exigences différentes vis-à-vis de l'humidité et de la température. Ainsi, en fonction de ces facteurs, les champignons contaminent les grains au cours de la culture dans le champ, au moment de la récolte, au cours de la fabrication et la transformation (ensilage par exemple) et pendant le transport et le stockage. Puis, si les conditions dans le milieu environnant sont favorables, ces champignons peuvent proliférer et produire des mycotoxines. Par conséquent, la prévention de la croissance fongique conduit efficacement à la prévention de l'accumulation de mycotoxines (Barros et al., 2008).

Au cours de ce travail, les différentes espèces fongiques contaminant le sorgho ont été déterminées selon les critères morphologiques puis leur identité a été confirmée par des outils moléculaires. Enfin, la capacité de production des mycotoxines des isolats appartenant aux genres *Fusarium* et *Aspergillus* a été testée.

### **2- Matériel et méthodes**

#### **2.1- Echantillons utilisés**

Soixante quatre (64) échantillons de sorgho ont été prélevés de plusieurs points de vente dans la région du Sahel en Tunisie en 2011 et 2012 afin d'obtenir une hétérogénéité des prélèvements. Les échantillons sont divisés en 2 lots. Un premier lot comporte trente-sept (37) échantillons de sorgho tunisien et un deuxième composé de vingt-sept (27) échantillons

## *Donées expérimentales*

importés de l'Égypte. Le poids minimum de l'échantillon est de 500 g. Tous les échantillons ont été conservés à 4°C dans des sacs en polyéthylène jusqu'à l'analyse.

### **2.2- Détermination de la mycobiota (flore fongique)**

L'étude de la mycobiota (flore fongique) présente dans les échantillons de sorgho est effectuée en trois étapes. En premier lieu, une énumération quantitative du nombre de champignons contenus dans chaque échantillon a été réalisée. Par la suite, la flore interne du sorgho a été identifiée macroscopiquement et microscopiquement. Enfin, l'identité de l'espèce fongique est confirmée par PCR.

#### **2.2.1- Enumération**

L'énumération a été réalisée sur un milieu solide en boîtes de pétri en utilisant la méthode de dilution. Des dilutions en série dans des tubes de peptone saline ont été réalisées pour chaque échantillon de sorgho : 10 g de sorgho sont pesés et mélangés pendant 15 min avec 90 ml de peptone saline puis, 1 ml de la suspension obtenue est prélevé puis mélangé avec 9 ml de peptone saline pour obtenir une dilution de l'ordre de  $10^{-1}$ . Des aliquotes de 100  $\mu$ l sont prélevées et placées sur la gélose de PDA (Potato dextrose agar) supplémentée avec 100 ppm de chloramphénicol et de DRBC (Dichloran rose bengal chloranphenicol). La composition des milieux de culture est mentionnée dans l'annexe 1. La présence du chloramphénicol, agent antibactérien, dans les deux milieux de culture permet d'éviter la croissance bactérienne. Le milieu DRBC ralentit le développement des mycètes envahissantes telles que les *Mucor* et les *Rhizopus*. Pour chaque échantillon de sorgho, 20 boîtes de pétri (10 pour chaque milieu de culture, en ordre de 5 boîtes pour la solution mère et 5 boîtes pour la dilution  $10^{-1}$ ) sont inoculées par 100  $\mu$ l de la suspension. Les boîtes de pétri inoculées sont incubées à 25°C pendant 7 jours avant l'énumération. Les boîtes contenant entre 10 et 100 CFU (colony forming unity : unité formant colonie) ont été utilisées pour le dénombrement. Les résultats sont exprimés en CFU par gramme d'échantillon. Si l'échantillon s'avère peu contaminé par les champignons c'est-à-dire que le nombre de colonies par boîtes est inférieur à 10, les boîtes de la plus faible dilution sont utilisées pour le dénombrement. L'identification des champignons est réalisée à l'aide du guide du Pitt et Hocking (1997). Tous les isolats sont conservés dans des boîtes en PDA.

## *Donées expérimentales*

### **2.2.2- Identification de la mycobiota (flore) interne du sorgho**

Pour isoler la mycobiota (flore) interne du sorgho, un sous-échantillon de 200 grains de chaque échantillon est désinfecté superficiellement dans une solution aqueuse d'hypochlorite de sodium à 2% pendant 2 min, puis rincé deux fois avec de l'eau distillée stérile pendant 1 min. Les grains sont placés aseptiquement sur la gélose à raison de 5 grains par boîte (Confrontation directe). Pour chaque échantillon, 20 boîtes de DRBC et 20 boîtes de VM (Vert de malachite), milieu spécifique aux *Fusarium*, sont utilisées (annexe I : composition des milieux de culture). Après incubation pendant 7 jours à 25 °C, les champignons ont été identifiés selon leurs critères morphologiques à l'aide du guide de Pitt et Hocking (1997). Tous les isolats sont conservés dans des boîtes en PDA. Les résultats de l'identification des espèces fongiques contaminant le sorgho sont exprimés en pourcentage de grains infectés dans chaque échantillon de la façon suivante :

$$\text{Moyenne (\%)} = \frac{\text{nombre de grains infectés par un genre ou espèce}}{\text{nombre total des grains}} \times 100$$

La fréquence et la densité relative des genres et des espèces sont calculées selon les formules de Marasas et al. (1988a) :

$$\text{Fréquence (\%)} = \frac{\text{nombre d'échantillons contaminés par un genre ou une espèce}}{\text{nombre total des échantillons}} \times 100$$

$$\text{Densité relative (\%)} = \frac{\text{nombre d'isolats d'un genre ou d'une espèce}}{\text{nombre total des genres ou espèces isolées}} \times 100$$

### **2.2.3- Confirmation de l'identité des espèces fongiques par les outils moléculaires**

#### **2.2.3.1- Extraction d'ADN**

Chaque isolat sélectionné pour l'identification par les outils moléculaires est cultivé dans un tube Eppendorf contenant 500µl du ME liquide (Malt extract). Après 2 jours d'incubation à 28°C sous agitation, le mycélium est centrifugé (10 min- 17500 x g). L'ADN est extrait avec 300 µl du tampon d'extraction (Tris-HCl à 200 mM et pH 8,5, NaCl à 250 mM, EDTA à 25 mM et SDS à 0,5 %). Pour rompre le mycélium, la suspension est agitée pendant 10 min dans un vortex en présence de 5 billes métalliques (acier inoxydable) afin de faciliter la lyse (Precellys, Bertin Technologies, France). Après centrifugation à 17500xg

## *Donées expérimentales*

pendant 10 min, 150µl d'acétate de sodium à 3 M sont ajoutés au surnageant qui est ensuite incubé pendant 10 min à -20°C. Par la suite, la suspension est centrifugée (10 min-17500xg) et le surnageant contenant l'ADN est transféré dans un nouveau tube Eppendorf. Les acides nucléiques sont précipités par addition d'un volume d'isopropanol. Après 5 min d'incubation à température ambiante, la suspension d'ADN est centrifugée et le culot est lavé avec de l'éthanol à 70% afin d'éliminer les sels résiduels. Enfin, l'ADN est re-suspendu dans 50 µl du tampon TE. La qualité et la concentration de l'ADN sont déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre NanodropND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington USA).

### **2.2.3.2- Déroulement de la PCR**

Des amorces spécifiques sont utilisées pour l'identification des espèces appartenant aux sections *Flavi* et *Nigri*, l'identification des *Fusarium* se fait par séquençage partiel de la transcription du gène du facteur d'élongation (TEF-1 $\alpha$ ) et du gène de la Beta tubuline ( $\beta$ -tubuline) en utilisant, respectivement, les paires d'amorces BT2A/BT2B et EF-1/EF-2. En outre, l'identification d'autres espèces potentielles toxigènes est réalisée par séquençage partiel de la région ITS et du gène de la  $\beta$ -tubuline (**tableau 4**).

Pour identifier les espèces appartenant à la section *Nigri*, une PCR multiplex avec les couples d'amorces spécifiques à *A. niger/A. awamori*, *A. carbonarius* et *A. tubingensis* est réalisée (**tableau 4**). Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume final de 10 µl contenant 1 µl du tampon 10 x, 0,25 µl de dNTP (10 mM), 0,5µl de chaque amorce (10 mM), 0,1µl d'ADN polymérase (5U/µl) (DFS- Taq ADN polymerase, BIORON, Allemagne), 4,65µl d'eau et 1µl de l'échantillon d'ADN (10ng/µl). Les mélanges réactionnels ont été incubés dans un thermocycleur pendant 35 cycles consistant en 30 s à 95°C, 45 s à 60°C et 1 min à 72°C.

L'identification des espèces *A. flavus* et *A. parasiticus* est effectuée en utilisant le couple d'amorces AfAfIT-F, AfAfIT-R. Deux extraits d'ADN d'*A. flavus* CECT 2695 et d'*A. parasiticus* CECT 2681 sont utilisés comme référence. Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume final de 10 µl contenant 1µl du tampon 10x, 0,25µl du dNTPs (10 mM), 0,5µl de chaque amorce (10 µM), 0,1µl du taq (DNA polymérase) (5 U/µl), 5,65µl de l'eau et 1µl de l'échantillon de l'ADN (une dilution de concentration= 10ng/µl). Les mélanges réactionnels ont été incubés dans un thermocycleur pendant 35 cycles consistant en 30 secondes à 95°C, 45 s à 70°C et 1 min à 72°C.

*Donées expérimentales*

**Tableau 4 : Couples d'amorces utilisés dans l'identification des espèces fongiques**

Espèces	Couples d'amorces	T° d'hybridation	Amorce sens	Amorce anti-sens	Références
<i>A. niger</i>	NIG1, NIG2	60°C	5'- GATTTGACAGCATT(CT/TC) CAGAA-3'	5'- AAAGTCAATCACAATCCAGCCC -3'	Susca et al., 2007
<i>A. carbonarius</i>	AckS10R, AckS10L	60°C	5'- CCCTGATCCTCGTATGATAGC G-3'	5'- CCGGCCTTAGATTTCTCTCACC- 3'	Selma et al., 2009
<i>A. tubingensis</i>	TUB1, TUB2	60°C	5'-TCGACAGCTATTTCCCCCTT- 3'	5'- TAGCATGTCATATCACGGGCAT- 3'	Susca et al., 2007
<i>A. flavus</i> ,	AfAfIT-F, AfAfIT-R	70°C	5'- CGCGCGAGATACTTCTTATAC T-3'	5'-GAGCCCACTTCGAAAATACC- 3'	Godet & Munaut, 2010
<i>A. parasiticus</i> <i>Fusarium spp.</i>	BT2A, BT2B	60°C	5'- GGTAACCAAATCGGTGCTGCT TTC-3'	5'- ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTG GC-3'	Glass & Donaldson, 1995
	ef1, ef2	53°C	5'- ATGGGTAAGGARGACAAGAC- 3'	5'- GGARGTACCAGTSATCATGTT-3'	O'Donnell et al., 1998
<b>Autres</b>	ITS1, ITS4	56°C	5'-TTTCCGTAGGTGAACCTGC- 3'	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3'	

## *Donées expérimentales*

Pour l'identification des espèces de *Fusarium*, un séquençage partiel des gènes du facteur d'élongation ef-1 alpha et de la  $\beta$ -tubuline est effectué après la réalisation des réactions de PCR dans un volume final de 50 $\mu$ l contenant 5 $\mu$ l du tampon 10 x, 1 $\mu$ l de dNTP (10 mM), 2 $\mu$ l de chaque amorce (10  $\mu$ M), 0,5 $\mu$ l d'ADN polymérase (5U/ $\mu$ l) (DFS- Taq ADN polymerase, BIORON, Allemagne), 37,5 $\mu$ l d'eau et 2 $\mu$ l de l'échantillon d'ADN (10ng/ $\mu$ l). Les mélanges réactionnels ont été incubés dans un thermocycleur pendant 35 cycles consistant en 30 s à 95°C, 45 s à 60°C et 1 min à 72°C si on utilise le couple d'amorces spécifiques au gène de  $\beta$ -tubuline ou 30 s à 95°C, 30 s à 53°C et 0,45 s à 72°C si la séquence amplifiée est le facteur d'élongation. Les produits de PCR qui se sont révélés positifs sont nettoyés par un kit de nettoyage et de purification de l'ADN (Ultra Clear PCR kit, MOBIO, USA). Le séquençage est réalisé par la société Macrogen (Corée du Sud). La recherche des similarités des séquences avec des bases de données publiques est réalisée en utilisant BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

### **2.2.3.3- Identification des produits de PCR**

L'identification des bandes d'ADN est réalisée suite à une électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR et une révélation sous UV. La préparation du gel se fait par cuisson pendant 2 min d'un mélange de 1,35g d'agarose et de 110ml de TAEIX (Tris HCl + EDTA) dans un four à microondes. Pour contrôler la migration, quelques gouttes de bleu du bromophénol sont ajoutées aux produits de PCR. On dépose 3 $\mu$ l d'un marqueur de poids moléculaire de part et d'autre du gel afin de déterminer la taille des bandes observées. Dans les autres puits du gel, on dépose 5 $\mu$ l de chaque échantillon mélangé au bleu de bromophénol. Après migration et trempage dans du bromure d'éthidium, l'analyse du gel s'effectue sous une lumière UV.

### **2.3-Capacité de production de mycotoxines**

Tous les isolats appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* reconnus producteurs d'OTA sont testés pour leur capacité de produire l'OTA selon la méthode décrite par Bragulat et al. (2001). Cette méthode consiste à repiquer les isolats sur une gélose à base d'extrait de levures appelée Czapek Yeast extract agar (CYA) à raison de 3 colonies d'un seul isolat par boîte de pétri (Pitt & Hocking, 1997). Les cultures sont incubées à 25°C pendant 7 jours. A partir de chaque culture, 3 morceaux d'agar sont coupés de différents points d'une des trois colonies puis extraits avec 1 ml de méthanol pendant 1 h. Les extraits obtenus sont

## *Données expérimentales*

filtrés à travers des filtres seringues, évaporés sous jet d'azote, dissout dans 500µl d'un mélange méthanol/eau (50/50) puis analysés par HPLC. La phase mobile est constituée par acétonitrile/eau milliQ/acide acétique (57/41/2). La longueur d'onde d'excitation est de 330nm et celle d'émission est de 460nm. Le temps de rétention de l'OTA est 7,1 min. Le volume d'injection est de 25µl avec un débit de 1 ml/min. La teneur en OTA est quantifiée sur la base de la réponse fluorométrique par rapport à celle de la gamme étalon de la solution standard. La limite de détection de l'OTA est 0,21 µg/kg (Bragulat et al., 2001). Cette méthode est aussi utilisée pour le dosage de la ZEN chez les colonies de *Fusarium* spp. La détermination de la concentration en ZEN a été effectuée par une détection de fluorescence ( $\lambda_{exc}$ = 274nm;  $\lambda_{em}$ = 455nm). La phase mobile est constituée d'acétonitrile/eau MilliQ (60:40) dont le pH est ajusté à 3,2 avec de l'acide acétique avec un débit de 1 ml/min. Le volume d'injection est de 100 µl. Le temps d'éluion est de 5,1min et la limite de détection de ZEN est 0,017µg/kg.

Pour vérifier si les Aspergilli appartenant à la section *Flavi* sont aflatoxinogènes ou non, la méthode de Bragulat et al. (2001) est utilisée avec quelques modifications. Tous les isolats sont d'abord cultivés sur un milieu CAM (Coconut agar medium) ; une gélose spécifique à base de noix de coco qui rend les espèces aflatoxinogènes capables d'émettre une fluorescence bleu-violette sous lumière UV (Lin & Dianase, 1976). Ces isolats aflatoxinogènes (émettant une fluorescence bleu-violette) sont repiqués sur CYA et incubés pendant 11 jours à 25°C. L'extraction se fait par homogénéisation, pendant 15min dans un agitateur magnétique, d'une colonie coupée en morceaux avec du méthanol (annexe III). Les extraits sont analysés par HPLC après filtration et évaporation sous jet d'azote. La détermination de la teneur en AFB1 est quantifiée sur la base de la réponse fluométrique ( $\lambda_{exc}$ = 362nm;  $\lambda_{em}$ = 425nm) par rapport à celle de la gamme étalon de l'AFB1. La phase mobile est constituée avec de l'eau/acétonitrile/méthanol (700:170:170) avec un débit de 1 ml/min.

Pour confirmer la détection de l'AFB1, chaque échantillon contenant la mycotoxine subit une dérivatisation par lumière UV de longueur d'ondes 254 nm. Pour cela, 200µl de l'extrait sont mélangés avec 700µl d'un mélange d'acide trifluoroacétique/ acide acétique glacial/ eau (20/10/70) pendant 8 min 5 sec à 65°C. La limite de détection de l'AFB1 est de 0,60µg/kg. Le volume d'injection est égal à 10µl. Le temps de rétention de l'AFB1 est 8 min.

## Donées expérimentales

### 3- Résultats et discussion

#### 3.1- Détermination de la mycobiota (flore fongique)

##### 3.1.1- Enumération

Les résultats de dénombrement des champignons sont présentés dans le **tableau 5**. La valeur moyenne obtenue de l'énumération est  $2,5 \cdot 10^3$  CFU/g pour le total des échantillons (de  $100$  à  $1,3 \cdot 10^4$  CFU/g pour le sorgho tunisien et de  $100$  à  $5,7 \cdot 10^3$  CFU/g pour le sorgho égyptien). **Il n'y a pas de différence significative entre les deux lots d'échantillons.** Au cours de cette étude, les moisissures les plus fréquemment rencontrées sont des espèces appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Alternaria* et *Penicillium*. Les espèces appartenant à *Aspergillus* section *flavi* et *nigri* sont les prédominantes. **Les niveaux de contamination obtenus dans notre étude sont plus faibles** que ceux trouvés par Lefeyedi et al. (2005) dont la valeur est de  $2,7 \cdot 10^4$  CFU/g. *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Phoma*, *Aspergillus* et *Penicillium* sont les genres les plus répandus dans les grains de sorgho (Da Silva et al., 2000 ; Alves dos Reis et al., 2010).

**Tableau 5 : Valeurs moyennes de dénombrement total des champignons ainsi que les principaux genres dans les échantillons de sorgho exprimées en CFU/g**

	Valeur moyenne de nombre des moisissures (CFU/g)		
	Tunisie	Egypte	Total
Dénombrement total	$2,8 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$
<i>Aspergillus</i> section <i>flavi</i>	$1,6 \cdot 10^2$	$3,2 \cdot 10^2$	$2,8 \cdot 10^2$
<i>Aspergillus</i> section <i>nigri</i>	$4,8 \cdot 10^2$	$4,2 \cdot 10^2$	$4,4 \cdot 10^2$
<i>Penicillium</i>	2	$1,0 \cdot 10^2$	$0,6 \cdot 10^2$
<i>Fusarium</i>	$1,1 \cdot 10^2$	$4,4 \cdot 10^2$	$2,2 \cdot 10^2$
<i>Rhizopus</i>	$0,2 \cdot 10^2$	$0,8 \cdot 10^2$	$0,5 \cdot 10^2$

CFU (Colony forming unity) unité formant colonie

##### 3.1.2- Détermination de la mycobiota interne du sorgho

Les résultats de la composition de la mycobiota (flore fongique) interne des grains de sorgho sont détaillés dans le **tableau 6**.

*Donées expérimentales*

**Tableau 6 : Composition de la mycobiota (flore fongique) du sorgho prélevé des marchés tunisiens durant les années 2011 et 2012**

(valeurs moyennes + erreurs)

Champignons	fréquence <sup>1</sup>			Densité relative <sup>2</sup>			Moyennes en pourcentage des grains infestés <sup>3</sup>		
	Tunisie	Egypte	total	Tunisie	Egypte	total	Tunisie	Egypte	total
<i>Aspergillus</i>	86,11±2,61	89,28±0,57	87,50±1,49	12,84±1,71	11,45±1,72	12,22±1,21	6,15±1,74	2,96±0,38	4,73±0,99
Section <i>Flavi</i>	58,33±1,82	53,57±0,23	56,25±1,06	5,59±0,93	4,65±0,69	5,19±0,61	3,4±1,22	1,33±0,16	2,54±0,71
Section <i>Nigri</i>	66,66±1,36	67,86±0,33	67,19±0,79	7,82±0,96	6,01±0,72	7,02±0,63	3,92±0,91	1,82±0,22	2,99±0,53
Section <i>Circumdati</i>	27,77±0,05	39,28±0,09	32,81±0,05	2,30±0,33	5,83±1,75	4,15±0,86	0,73±0,03	0,91±0,06	0,82±0,03
Section <i>Terri</i>	11,11±0,13	25,00±0,09	17,18±0,08	9,48±1,57	3,69±0,34	5,79±0,76	1,33±0,09	0,86±0,06	1,03±0,05
<i>Eurotium</i>	30,55±0,89	60,71±0,39	43,75±0,46	7,04±1,82	5,43±1,14	6,07±1,02	2,30±0,59	1,57±0,26	1,86±0,31
<i>Penicillium</i>	66,66±0,28	60,71±0,25	64,06±0,19	4,09±0,49	5,41±0,68	4,64±0,41	1,61±0,19	1,57±0,17	1,59±0,13
<i>Fusarium</i>	97,22±1,67	92,86±1,71	95,31±1,21	24,35±2,81	22,74±2,08	23,66±1,82	9,24±1,11	7,66±1,14	8,57±0,80
<i>Alternaria</i>	83,33±3,36	78,57±0,64	81,25±2,36	23,71±3,53	8,01±1,01	17,31±2,28	10,51±2,24	2,53±0,43	7,32±1,39
<i>Curvularia</i>	72,22±0,93	85,71±1,06	78,12±0,71	9,11±1,45	15,93±1,94	12,38±1,25	3,15±0,62	4,83±0,71	3,96±0,47
<i>Cladosporium</i>	27,77±0,22	39,28±0,19	32,81±0,14	3,94±0,44	2,98±0,31	3,44±0,27	1,20±0,14	1,03±0,13	1,11±0,09
<i>Drechslera</i>	69,44±0,44	89,28±0,72	78,12±0,41	6,86±1,02	9,86±1,16	8,36±0,78	2,58±0,29	3,12±0,48	2,85±0,27
<i>Rhizopus</i>	11,11±0,00	10,71±0,00	10,94±0,00	1,36±0,14	1,98±0,14	1,62±0,11	0,66±0,00	0,66±0,00	0,66±0,00
<b>Autres champignons</b>	88,89±2,26	100±1,32	93,75±1,37	19,59±2,37	22,74±2,32	21,06±1,66	8,54±1,51	6,93±0,88	7,79±0,91

<sup>1</sup>Fréquence (%)=Nombre d'échantillons contaminés par une espèce ou un genre\*100/ nombre total d'échantillons.

<sup>2</sup>Densité relative(%)= nombre d'isolats d'une espèce ou genre \*100/ nombre total de champignons isolés.

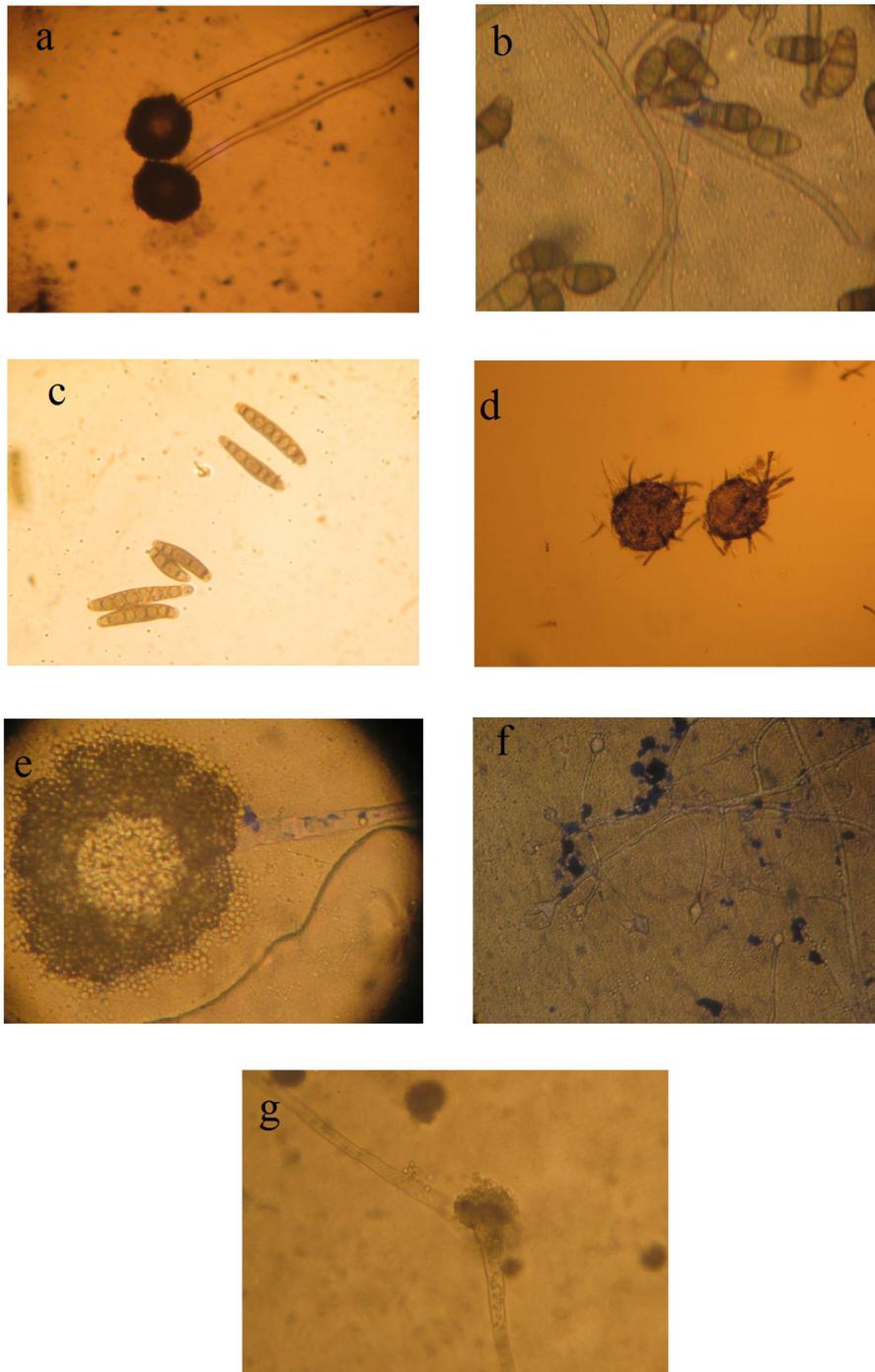
<sup>3</sup>Moyenne en pourcentage(%)= Nombre de grains infestés par une moisissure dans chaque echantillon \* 100/ nombre total de grains.

## *Donées expérimentales*

La contamination par les champignons a été observée dans tous les échantillons analysés. Les principaux genres isolés classés par ordre décroissant de fréquence sont : *Fusarium* (95,3%), *Aspergillus* (87,5%), *Alternaria* (81,2%), *Curvularia* (78,1%), *Drechslera* (78,1%), *Penicillium* (64,0%), *Eurotium* (43,7%) et *Cladosporium* (32,8%). Concernant la densité relative, les valeurs les plus importantes sont observées chez *Fusarium* (23,6%), *Alternaria* (17,3%) et *Aspergillus* (12,2%). La figure 10 présente quelques observations microscopiques de différents genres fongiques. Les isolats appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* ont été repiqués sur des boîtes de PDA avant de les identifier. L'incidence des champignons filamenteux trouvés au cours ce travail est similaire à celle obtenue dans d'autres études réalisées au Brésil (Da Silva et al., 2000), Thaïlande (Pitt et al., 1994) et l'Inde (Sharma et al., 2011).

La prédominance des champignons de stockage tel que *Aspergillus*, *Penicillium* et *Eurotium* est due au fait que les échantillons ne sont pas fraîchement récoltés. Parmi les isolats appartenant au genre *Aspergillus*, *Aspergillus* section *flavi* et section *nigri* sont les plus fréquents dans cette étude avec des valeurs de densité relative respectivement de 5,2 et 7,0%. La faible fréquence d'*A. flavus* et *A. parasiticus* est en accord avec l'étude de Ratnavathi et Sashidhar (2003) et l'étude de Alves dos Reis et al. (2010). Selon ces auteurs, les grains de sorgho sont moins sensibles que les autres céréales à l'infestation par *Aspergillus* grâce à leurs propriétés physiques et leur composition chimique. Toutefois, Da Silva et al. (2000) ont montré la contamination du sorgho brésilien par des espèces du genre *Aspergillus* avec une fréquence élevée (42%) où *A. flavus* est l'espèce la plus répandue. Il faut noter que les différences entre nos résultats et ceux de Da Silva (2000) sont peut être dues à l'absence de la désinfection de la surface des grains de sorgho avant la culture dans l'étude de ce dernier. D'autre part, les espèces d'*Aspergillus* appartenant aux sections *circumdati* et *terrei* ont été détectées dans les grains de sorgho au cours de ce travail. *A. flocculosus* et *A. terreus* sont respectivement les espèces les plus isolées. *Eurotium repens* et *Eurotium chevalieri* sont les espèces d'*Eurotium* les plus courantes dans les échantillons analysés. D'autres espèces ont été également identifiées : *Aspergillus versicolor*, *A. sidowii* et *Emericella nidulans*.

*Donées expérimentales*



**Figure 10 : Observation microscopique de quelques moisissures : a) *Aspergillus* section *Nigri*, b) *Curvularia* spp., c) *Drechslera* spp., d) *Chaetomium* spp., e) *Aspergillus* section *Flavi*, f) *Rhizopus* spp., g) *Aspergillus fumigatus*.**

## *Donées expérimentales*

La fréquence de contamination des grains de sorgho par le genre *Penicillium* est très faible. Parmi les 30 isolats *Penicillium* spp. isolés de la mycobiota interne du sorgho, les espèces dominantes trouvées sont ***P. citrinum* (20 isolats)**. D'autres espèces sont détectées au cours de cette étude : *P. funiculosum* (6 isolats) et *P. purpurogenum* (4 isolats). Des résultats similaires ont été obtenus par Gonzalez et al. (1997) dans le sorgho de l'Argentine.

*Alternaria* spp. a été également présente dans les échantillons étudiés avec une fréquence élevée et *A. tenuis* est la principale espèce observée dans les d'échantillons de sorgho (58,28%). D'autres espèces ont été identifiées telles que *Curvularia lunata*, *Curvularia pallescens*, *Phoma sorghina*, *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium fulvum* (syn. *Passolorafulva*), *Chaetomium funicola*, *Bipolaris* spp., *Ulocladium* spp., *Epicoccum nigrum*, *Trichothecium roseum*, *Nigrospora oryzae*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor* spp.. D'autres études ont montré que ces espèces contaminent les grains de sorgho de plusieurs pays comme l'Argentine, le Bangladesh, le Brésil, l'Afrique du Sud et la Thaïlande (Pitt et al., 1994 ; Gonzalez et al., 1997 ; Lefyedi et al., 2005 ; Isakeit et al., 2008 ; Alves dos Reis et al., 2010).

### **3.1.3- Confirmation de l'identité de quelques isolats par des outils moléculaires**

La figure 11 représente quelques exemples de gels après révélation sous U.V. les photos montres des bandes claires des produits de PCR réalisées pour *Aspergillus* section *nigri*, *flavi* et *Fusarium*.

## Donées expérimentales

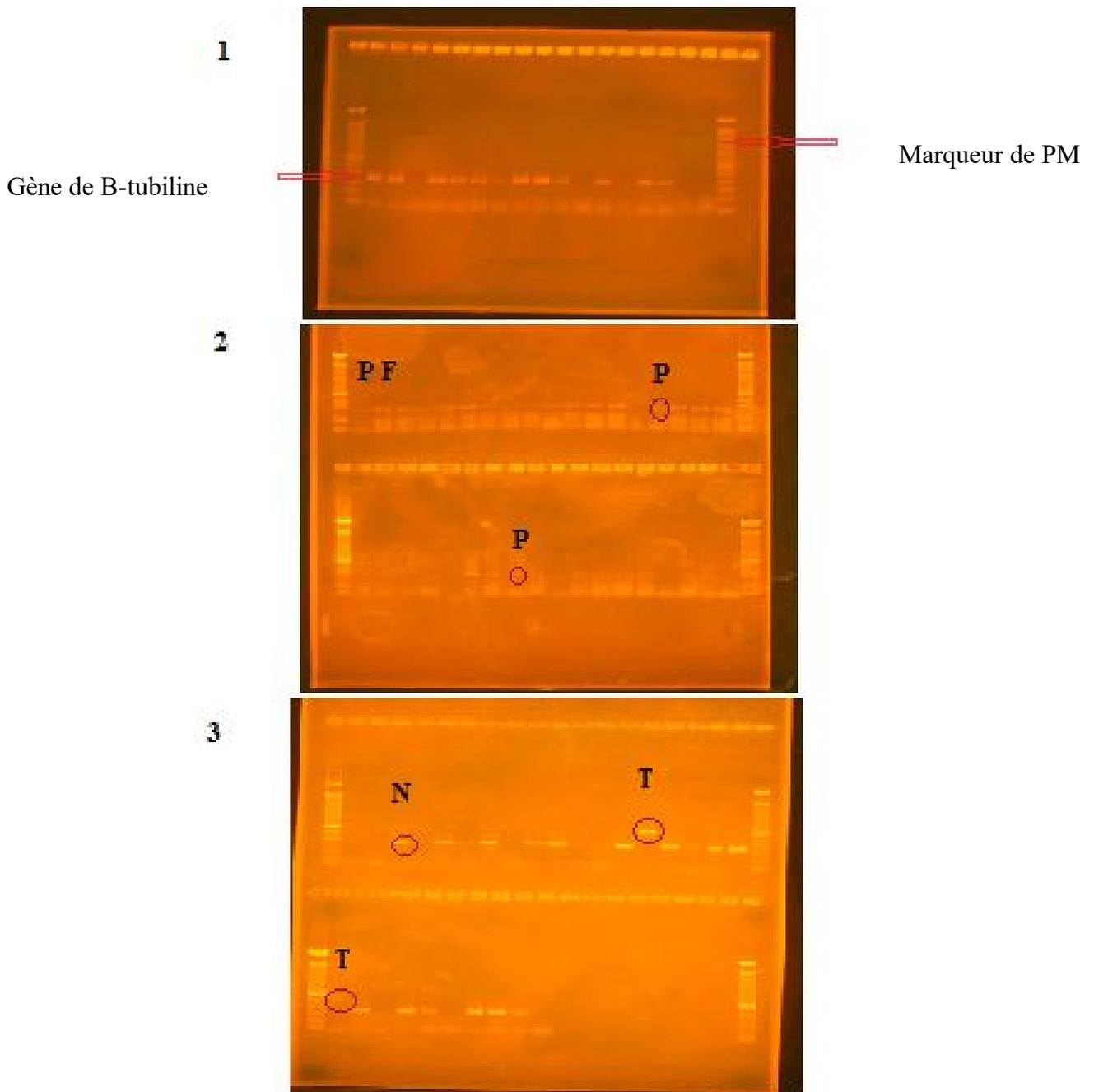


Figure 11 : Exemple de gels d'agarose après électrophorèse : 1) bandes d'ADN correspondant au gène de  $\beta$ -tubiline utilisé pour le séquençage pour l'identification des *Fusarium* spp. 2) identification d'*Aspergillus flavus* (F) et *A. parasiticus* (P). 3) identification des espèces d'*Aspergillus* section *Nigri*, bandes correspondant à *A. tubingensis* (T) et *A. niger* (N).

## Donées expérimentales

Dans nos échantillons, *A. flavus* est l'espèce la plus courante parmi la section *flavi* dans les grains de sorgho tunisien et égyptien (**tableau 7**). Nous avons analysé 91 isolats d'*Aspergillus* section *flavi* dont 82 (90,11%) ont été identifiés comme *A. flavus*. Parmi les 347 isolats d'*Aspergillus* section *nigri*, *Aspergillus niger* aggregates autre qu'*Aspergillus niger/awamori* et *Aspergillus tubingensis* sont les plus dominants. *Aspergillus niger* comprend 10 espèces bisériées comme par exemple *A. brasiliensis*, *A. acidus* et *A. neoniger*. Seul *A. niger* est connu pour être en mesure de produire l'OTA (Varga et al., 2011) (**tableau 12**). D'autres espèces d'*Aspergillus niger* aggregates sont plus courantes dans le sorgho égyptien qu'*A. niger* et *A. tubingensis*, tandis que ***A. niger* est le dominant dans le sorgho tunisien**. Ces espèces ont été trouvées dominantes dans le sorgho en Argentine, Brésil et Thaïlande (Pitt et al., 1994 ; Gonzalez et al., 1997 ; Alves dos Reis et al., 2010). ***Aspergillus carbonarius* n'a pas été détecté dans cette présente étude**. Cependant, cette espèce a été détectée avec une fréquence élevée dans le sorgho indien (Priyanka et al., 2014).

**Tableau 7 : Caractérisation des espèces appartenant à *Aspergillus* sections *flavi* et *nigri* par les outils moléculaires**

Espèces	Tunisie		Egypte		Total	
	N	Fréquence (%)	N	Fréquence (%)	N	Fréquence (%)
<i>A. flavus</i>	51	91,07	31	88,57	82	90,11
<i>A. parasiticus</i>	5	8,93	4	11,43	9	9,89
<i>Aspergillus</i> section <i>flavi</i>	56		35		91	
<i>Aspergillus niger</i>	89	38,2	30	26,32	119	34,3
<i>Aspergillus tubingensis</i>	57	24,46	23	20,18	80	23,05
Autres <i>A. niger</i> agrégats	87	37,34	61	53,51	148	42,65
<i>Aspergillus</i> section <i>nigri</i>	233		114		347	

N: nombre d'isolats analysés par PCR.

Le genre *Fusarium* représente le composant le plus fréquent dans la flore fongique du sorgho pour les deux lots des échantillons (Tunisie et Egypte). Les caractères morphologiques et culturaux de 451 isolats ensemencés sur gélose de PDA sont étudiés. Parmi ces isolats, 59 présentant des caractéristiques morphologiques et culturelles différentes sont sélectionnés pour une identification moléculaire. L'identification est réalisée en utilisant la base de données BLAST n-searches du Gen Bank par détermination du niveau de

## *Donées expérimentales*

similarités avec des séquences connues de *Fusarium*. **Douze espèces de *Fusarium* :** *F. incarnatum* (complexe *F. equiseti-incarnatum*) (37 isolats), *F. verticillioides* (*Gibberella moniliformis*) (4 isolats), *F. thapsinum* (2 isolats), *F. proliferatum* (2 isolats), *F. pseudonygamai* (2 isolats), *F. nelsonii* (3 isolats), *F. venenatum* (2 isolats), *F. pseudograminearum* (1 isolat), *F. brachygibbosum* (1 isolat), *F. acuminatum* (1 isolat), *F. lacertarum* (1 isolat), *F. sambucinum* (*Gibberella pulicularis*) (2 isolats) et *G. xylarioides* (1 isolat) ont été identifiées sur la base de la similarité de séquence. L'espèce *Fusarium incarnatum* est la plus répandue dans le sorgho (37 des 59 isolats testés). Cette espèce a été associée à des grains de sorgho en Inde (Sharma et al., 2011; Divakara et al., 2013) Et l'Argentine (Gonzalez et al., 1997). **Les espèces de *Fusarium* appartenant à la section *Liseola* (*F. verticillioides*, *F. thapsinum*, *F. proliferatum* et *F. pseudonygamai*) sont aussi fréquentes (10 isolats parmi 59).** Les espèces de *Fusarium* incluses dans la section *liseola* sont connues pour être associées au sorgho de différents pays (Divakara et al., 2013). L'espèce *F. thapsinum* est la plus dominante en Inde (Sharma et al., 2011) et en Ouganda (Prom et al., 2011), et elle a été signalée comme étant une espèce commune dans les grains de sorgho (Leslie et al., 2005). En plus, les espèces de cette section sont connues par leur capacité de produire les fumonisines, la moniliformine, l'acide fusarique, la beuvericine (Leslie et al., 2005). L'incidence des espèces de *Fusarium* de la section *liseola* devrait être responsable de la contamination par les fumonisines dans le sorgho de différents pays (Scott, 2012). La **figure 12** représente un arbre phylogénétique montrant la similarité génétique entre quelques isolats de *Fusarium* identifiés au cours de cette étude (*F. cf incarnatum* CS-2011, *F. incarnatum* NRRL 31160, *F. cf incarnatum* MLSTS, *F. nelsonii* NRRL28505, *F. equiseti* et *G. moniliformis* NRRL25102) et autres trouvés sur la base de données GenBank. Les distances évolutives ont été calculées en utilisant la méthode p-distance. L'analyse a impliqué 24 séquences nucléotidiques. Les analyses évolutionnistes ont été menées en utilisant le logiciel MEGA5. L'arbre phylogénétique montre 4 groupes de *Fusarium* : *F. incarnatum*, *F. nelsonii*, *F. equiseti* et *G. moniliformis*. L'arbre montre le degré de similarité entre les différentes souches.

## Donées expérimentales

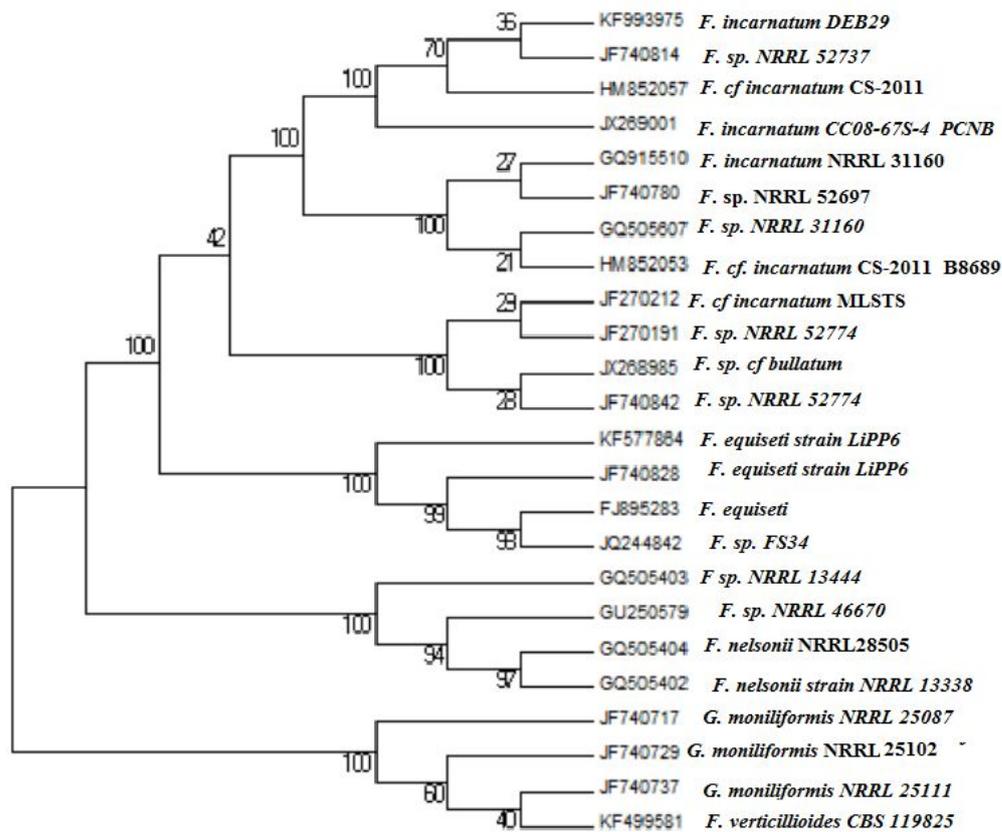


Figure 12 : Arbre phylogénétique montrant les relations évolutives déduites en utilisant la méthode UPGMA

En conclusion, l'identification précise des espèces est essentielle pour évaluer le risque de contamination par les mycotoxines puisque toutes les espèces dans un genre ne sont pas en mesure de produire des mycotoxines et le niveau de production varie selon les espèces et les souches mycotoxinogènes. Au cours des dernières décennies, la taxonomie fongique classique s'est orientée vers l'identification moléculaire, car il est très difficile d'établir des systèmes de taxonomie sur la base de caractéristiques phénotypiques (Begerow et al., 2010). Par conséquent, l'importance des méthodes moléculaires pour différencier les taxons des champignons connus en tant que producteurs importants de mycotoxines tels qu'*Aspergillus* spp. *Penicillium* spp. et *Fusarium* spp. est soulignée.

Les séquences les plus couramment utilisées pour faire la distinction entre les espèces sont des portions de séquences génomiques codant pour des gènes ribosomiques nucléaires qui comprennent la grande sous-unité (26S ou 28S) et la petite sous-unité (18S) séparées par l'espace interne transcrit « Internal transcribed Space » (ITS), le gène de la  $\beta$ -tubuline et le

## *Donées expérimentales*

gène du facteur d'élongation 1-alpha (White et al., 1990 ; O'Donnell, 1993 ; Glass & Donaldson, 1995). Les amorces utilisées pour amplifier les régions mentionnées ci-dessus ne sont pas toutes fonctionnelles aussi bien pour toutes les espèces. Ainsi, dans chaque cas, nous devons utiliser le marqueur le plus largement accepté pour la distinction entre les représentants de chaque genre ou section. Néanmoins, peu de travaux ont été réalisés pour caractériser la diversité fongique dans le sorgho par identification moléculaire. Da Silva et al. (2006) ont étudié la variabilité génétique de 21 souches de *Fusarium verticillioides* isolées du sorgho cultivé dans l'état de São Paulo, au Brésil, en utilisant les marqueurs SPAR (Single primer Amplification Reaction). Divakara et al. (2013) ont identifié et caractérisé 27 *Fusarium* spp., isolés à partir de 58 échantillons de semences de sorgho collectés à travers l'Inde par séquençage du gène de transcription du facteur d'élongation 1-alpha et analyse des polymorphismes du Inter Simple Sequence Repeat (ISSR). Priyanka et al. (2014) ont étudié la distribution diversifiée de 200 souches d'*Aspergillus* sur un total de 320 échantillons de maïs, de riz, de sorgho et de arachide par des tests de PCR spécifiques à l'espèce étudiée.

**Cependant, et à notre connaissance, il n'y a pas de publications antérieures sur la mycobiota du sorgho africain dans lequel les méthodes moléculaires sont utilisées pour différencier les taxons. Dans notre étude, des isolats de *Fusarium* et *Aspergillus* ont été caractérisés par des méthodes moléculaires. De plus, et vu le nombre élevé d'isolats identifiés (plus de 600 isolats), ce travail pourrait aider à clarifier l'apparition de souches productrices de mycotoxines dans des échantillons de sorgho en provenance de l'Afrique.**

### **3.2- Capacité de production de mycotoxines**

La figure 13 montre des photos des isolats d'*Aspergillus flavus* cultivés sur CYA et CAM. Parmi les 91 isolats d'*Aspergillus* section *flavi*, 33 isolats testés (36,26%) sont en mesure de produire des aflatoxines. **Tous les isolats positifs appartiennent à l'espèce *Aspergillus flavus* (40,24%) et produisent des niveaux détectables d'aflatoxine B1 et B2 à des concentrations allant de 0,60 à 15,00 µg/kg.** Des études similaires ont été menées dans le sorgho en provenance du Brésil et de l'Inde. Au Brésil, Da Silva et al. (2000) ont constaté que 64,4% des souches d'*A. flavus* isolées du sorgho sont aflatoxigènes, avec une concentration d'aflatoxine B1 + B2 allant de 12,0 à 3282,5 µg/kg. Dans les échantillons de sorgho indien, Divakara et al. (2014) ont constaté que 83,8% des souches d'*A. flavus* sont aflatoxigènes. Pour *Aspergillus* section *Nigri*, nous avons testé 347 isolats, **le pourcentage**

## *Donées expérimentales*

d'isolats positifs OTA a été très faible (4,61%). Ce faible pourcentage est lié à l'absence de détection des isolats d'*Aspergillus carbonarius* qui est l'espèce la plus ochratoxinogène dans la section *Nigri*. Les 16 isolats ochratoxinogènes produisent l'OTA à des concentrations allant de 0,21 à 1,50 µg/kg. La figure 14 montre une photo de colonie d'*Aspergillus* section *nigri* sur CYA.

Un isolat d'*Aspergillus flocculosus* (figure 13) (*Aspergillus* section *Circumdati*) a montré la plus grande capacité de production d'OTA (492,33 µg/kg). Cette espèce a été signalée par sa capacité de produire de grandes quantités d'OTA (Frisvad et al., 2004), mais c'est la première fois qu'on l'isole à partir des grains de sorgho.

**Aucune des espèces de *Penicillium* isolées n'est trouvée productrice d'OTA.**

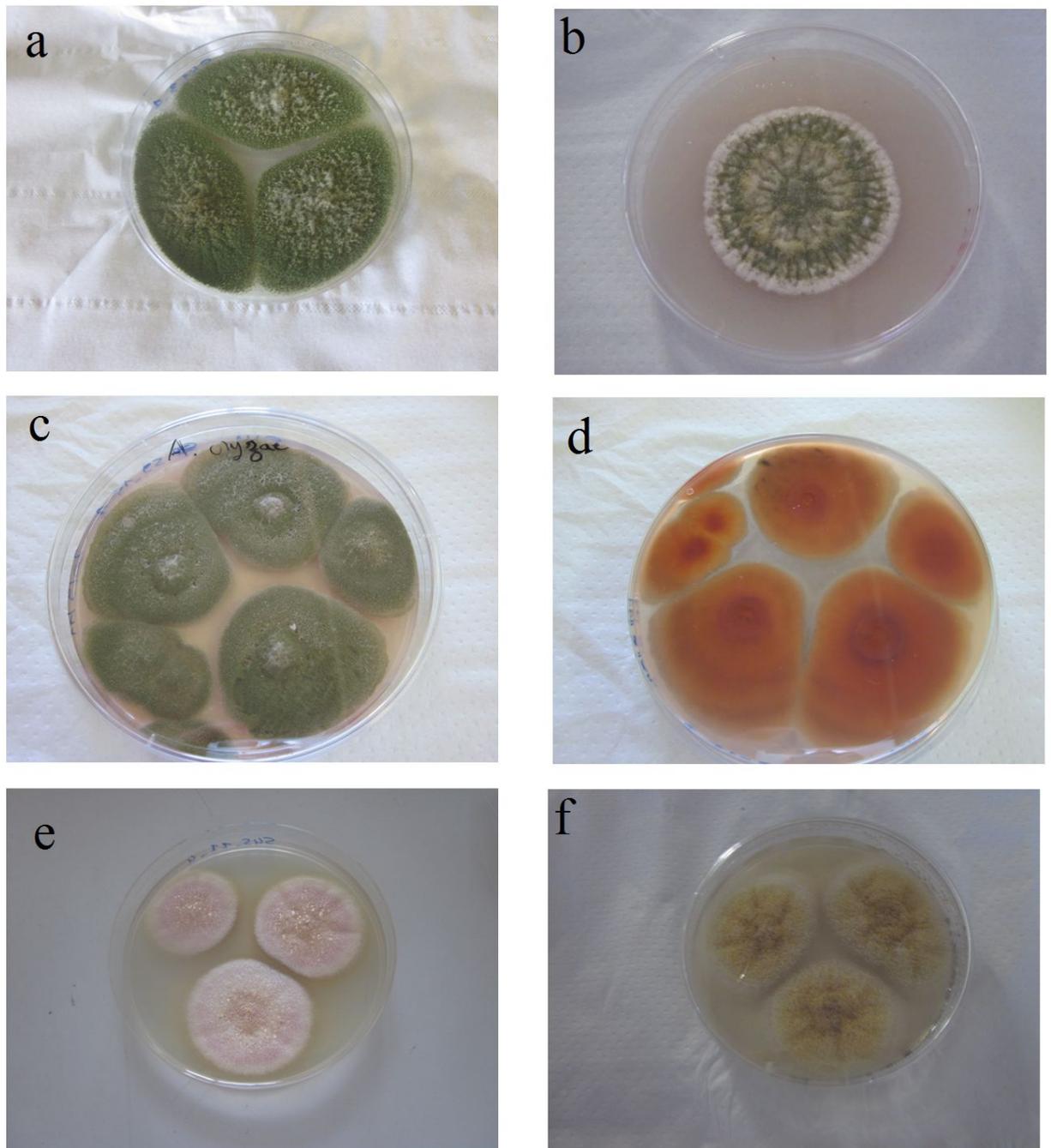
Concernant la production de ZEN par *Fusarium*, nous avons trouvé 50 isolats de *Fusarium* ayant une capacité de produire la zéaralénone (11,09%). Ces isolats produisent des niveaux détectables de cette mycotoxine à des concentrations allant de 0,017 à 4,61µg/kg. Ces faibles valeurs pourraient s'expliquer par la prédominance des espèces du complexe *Fusarium incarnatum-equiseti* et l'absence de détection des espèces de *Fusarium* connues productrices de concentrations élevées de zéaralénone telles que *F. graminearum* et *F. culmorum*. La figure 14 montre des photos de colonies de *Fusarium* cultivés sur CYA.

Le tableau 8 montre la fréquence et les intervalles de production de mycotoxines des isolats testés au cours de ce travail.

**Tableau 8 : Capacité de production de mycotoxines par des isolats appartenant aux genres *Aspergillus* et *Fusarium* testés sur CYA**

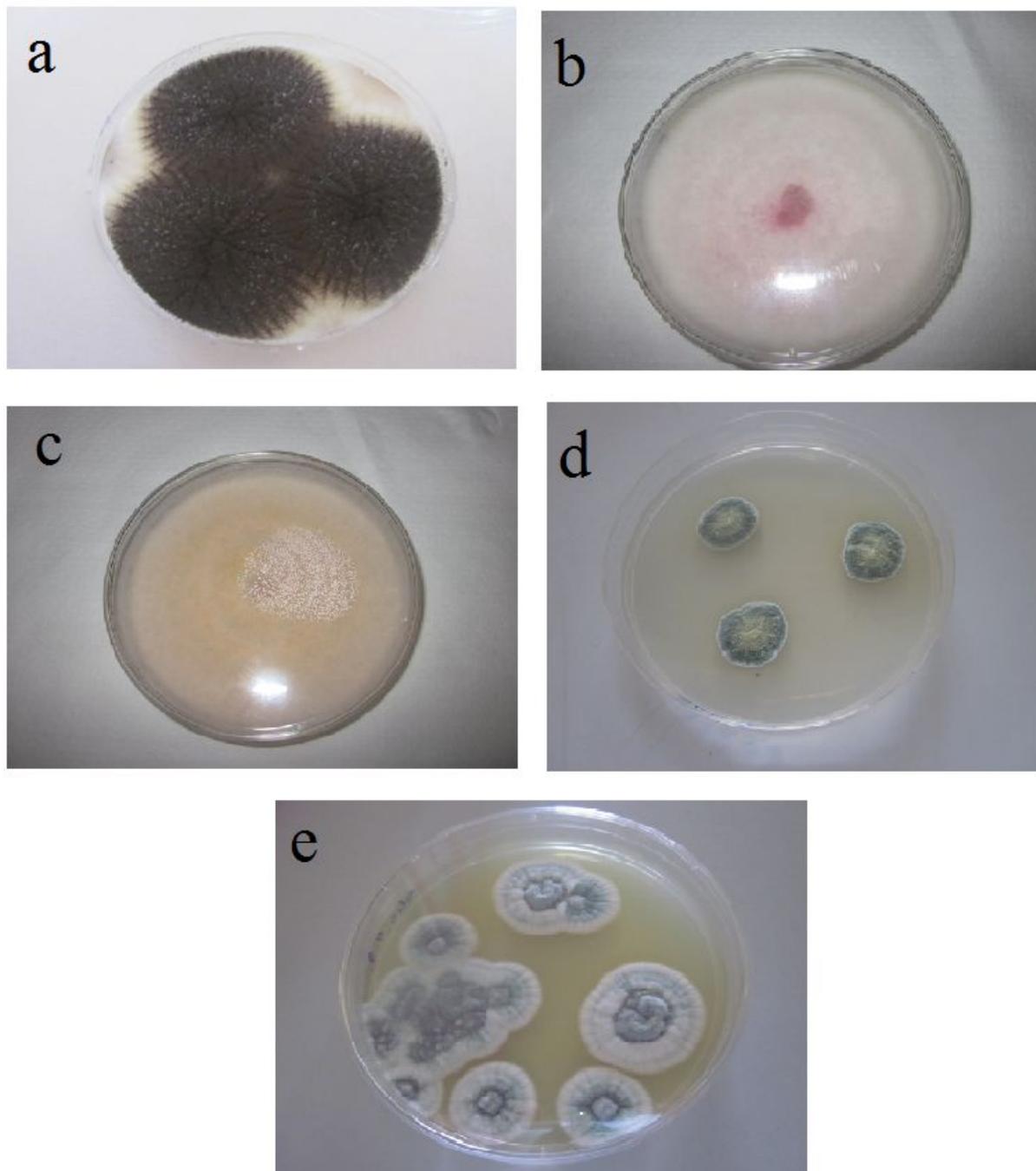
	Nombre	Fréquence (%)	Production (µg/kg)
<i>A. section nigri</i>	16	4,61	0,21- 1,50 (OTA)
<i>A. flocculosus</i>	1	100	492,33 (OTA)
<i>A. section flavi</i>	33	36,26	0,60 - 15,00 (AFB1)
<i>Fusarium spp.</i>	50	11,09	0,017 - 4,61 (ZEN)

## Donées expérimentales



**Figure 13 : Observation macroscopique de quelques moisissures a) culture de 7 jours d'*Aspergillus* section *Flavi* sur CYA. b) colonie d'*Aspergillus flavus* agée de 7 jours sur CAM. c) et d) culture de 7 jours d'*Aspergillus oryzae* sur CYA (avant et arrière). e) culture de 7 jours d'*Aspergillus flocculosus*. f) colonies d'*Aspergillus* section *Circumdati*.**

## Donées expérimentales



**Figure 14 : Observation macroscopique de quelques moisissures a) culture de 7 jours d'*Aspergillus* section *Nigri* sur CYA. b) colonie de 7 jours de *Fusarium incarnatum-equiseti* sur CYA. c) colonie de 7 jours de *Fusarium verticillioides* sur CYA. d) culture d'*Eurotium* spp. sur CYA. e) culture de *Penicillium* spp. sur CYA.**

## *Donées expérimentales*

### **4- Conclusion**

Les résultats de notre étude ont révélé la dominance des espèces de *Fusarium* suivies par les espèces d'*Aspergillus* et *Alternaria* dans les échantillons étudiés. Aucune différence dans la composition de la mycobiota n'a été observée entre les deux lots d'échantillons (en provenance de la Tunisie et de l'Egypte). Nous avons aussi montré la présence des espèces productrices d'AFB1, OTA et ZEN. **L'identification des espèces appartenant à *Fusarium* section *liseola* capables de produire les fumonisines et l'espèce *Penicillium citrinum* productrice de citrinine nous incite à dépister la présence de ces deux mycotoxines dans le sorgho.** Ces résultats montrent également la nécessité d'une surveillance de routine du sorgho à la fois pendant la récolte et le stockage afin d'éviter la croissance fongique et l'accumulation de mycotoxines dans les grains de sorgho, ainsi que la nécessité d'une analyse de routine des lots de sorgho afin d'établir un traitement supplémentaire de décontamination précédant la production alimentaire.

La détermination de l'incidence des mycotoxines (AFB1, OTA et ZEN) permet de savoir s'il y a une corrélation entre la contamination par les mycotoxines et les moisissures.

## **Chapitre II : Incidence de l'Aflatoxine B1, de l'Ochratoxine A et de la Zéaralénone dans le sorgho**

### **1- Introduction**

La Tunisie est un pays de l'Afrique du Nord caractérisé par un climat chaud et humide qui semble être favorable à la prolifération des champignons et la contamination des aliments par les mycotoxines. Beaucoup de denrées alimentaires tels que les céréales et leurs dérivés, les fruits secs et les épices sont une source d'exposition aux mycotoxines (Filali et al., 2001). Des enquêtes préliminaires sur les mycotoxines en Tunisie ont montré des niveaux relativement élevés en aflatoxines dans le pin d'Alep et le sorgho (Boutrif et al., 1977). Depuis 1977, plusieurs études ont confirmé la contamination des produits alimentaires tunisiens par les aflatoxines (Saïd et al., 1998 ; Ghali et al., 2008 ; Oueslati et al., 2014). D'autres chercheurs ont montré la contamination des céréales en Tunisie par l'OTA, la ZEN et les aflatoxines (Ghali et al., 2009b ; Zaïed et al., 2012b). La co-occurrence des aflatoxines, OTA et ZEN dans les aliments tunisiens a été détectée dans le sorgho, les épices et les fruits secs (Ghali et al., 2008). Au cours de ce travail, nous nous sommes proposé d'étudier l'incidence de l'AFB1, l'OTA et la ZEN dans le sorgho commercialisé en Tunisie.

### **2- Matériel et méthodes**

#### **2.1- Echantillons**

Les soixante-quatre (64) échantillons de sorgho dont la mycobiota a été déterminée dans le premier chapitre ont été utilisés pour la détermination de l'incidence de l'AFB1, l'OTA et la ZEN dans le sorgho commercialisé en Tunisie. Les échantillons sont divisés en 2 lots. Un premier lot comporte trente-sept (37) échantillons de sorgho tunisien et un deuxième lot composé de vingt-sept (27) échantillons de sorgho importé de l'Egypte.

#### **2.2- Réactifs**

Tous les réactifs : chlorure de potassium, chlorure de sodium, l'acide phosphorique, l'acide chlorhydrique, l'acide citrique et l'acide acétique sont de qualité pour analyse. Les solvants organiques : le méthanol, l'acétonitrile, le propanol-2-ol, l'hexane, le chloroforme et le dichlorométhane sont de qualité HPLC. Toutes les solutions aqueuses et la phase mobile utilisée en HPLC sont préparées avec de l'eau déionisée (deminéralisée). Les solutions standards de l'AFB1, l'OTA et la ZEN ont été fournies par Sigma Chemicals (St. Louis, MO,

## *Donées expérimentales*

USA). Le méthanol, l'acétonitrile, l'hexane, le chloroforme, le dichlorométhane, l'acide citrique, l'acide acétique et l'acide trifluoroacétique ont été fournis par Lobachemie (Inde). Le chlorure de potassium, le chlorure de sodium et l'acide orthophosphorique ont été fournis par Scharlau (Sentmenat, Espagne). L'acide chlorhydrique, la diatomite (célite 545) et l'hydroxyde de sodium (NaOH) ont été obtenus à partir de Prolabo (Fontenay S / Bois, CE).

### **2.3- Equipement**

Pour l'analyse des mycotoxines dans les aliments, le travail doit être réalisé dans un laboratoire équipé en : un spectrophotomètre, une hotte à flux laminaire, un agitateur magnétique, un vortex, un moulin à grains, une balance de précision, un évaporateur rotatif, un système d'évaporation sous jet d'azote, un appareillage pour HPLC, des réfrigérateurs et toute la verrerie nécessaire (Erlenmeyers, vials ou tubes à vis, micropipettes, béchers, ampoules de décantation, ballons à col rodé, entonnoirs....).

### **2.4- Préparation des solutions standards**

#### **2.4.1- Contrôle du spectrophotomètre**

Pour vérifier la fiabilité du spectrophotomètre, il faut tout d'abord déterminer le facteur de correction CF. Le protocole consiste à préparer les solutions suivantes :

- Une solution d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) à 0,018 N (mélanger 1 ml de  $H_2SO_4$  dans 2 litres de  $H_2O$ ).
- Des solutions de bichromate de potassium ( $K_2Cr_2O_7$ ) à des concentrations différentes :
  - Solution (A) 0,4 mM : dissoudre 117,68 mg de  $K_2Cr_2O_7$  pur (125 mg de  $K_2Cr_2O_7 H_2O$ ) dans un litre de la solution de  $H_2SO_4$  préalablement préparée.
  - Solution (B) 0,2 mM : mélanger 25 ml de la solution (A) dans 25 ml de  $H_2SO_4$  à 0,018 N.
  - Solution (C) 0,1 mM : ajouter 25 ml de  $H_2SO_4$  à 0,018 N à 25 ml de la solution (B).

Le pouvoir absorbant (A) des 3 solutions est déterminé par lecture de la valeur de D.O au spectrophotomètre à 350 nm contre un blanc de  $H_2SO_4$  à 0,018 N. Puis, la valeur de l'absorption molaire ( $\epsilon$ ) des 3 solutions est calculée en appliquant la formule suivante (AOAC, 2000) :

$$\epsilon = \frac{A \times 1000}{c}$$

c : concentration en mmol/l

## Donées expérimentales

A : D.O ou la valeur d'absorbance lue sur le spectrophotomètre

Les valeurs des concentrations, des absorbances et des coefficients d'extinction molaire correspondant aux trois solutions préparées sont présentées dans le **tableau 9**.

**Tableau 9 : Valeurs des concentrations (mM), du pouvoir absorbant A (D.O) et du coefficient d'extinction molaires ( $\epsilon$ ) des trois solutions A, B et C déterminées avec un spectrophotomètre à 350 nm contre un blanc de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

	Concentration (mM)	A	$\epsilon$
<b>Solution A</b>	0,4	1,232	3080
<b>Solution B</b>	0,2	0,61	3050
<b>Solution C</b>	0,1	0,298	2980

Pour calculer la valeur du CF, qui doit être comprise entre 0,95 et 1,05, il faut déterminer la valeur moyenne des trois  $\epsilon$  calculées (AOAC, 2000) :

$$\epsilon(\text{moy}) = \frac{(\epsilon 1 + \epsilon 2 + \epsilon 3)}{3}$$

Le facteur de correction CF correspond au rapport entre la valeur d'extinction molaire de la solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et la valeur moyenne d'absorbance molaire des trois solutions de bichromate de potassium. Il est calculé en appliquant la formule suivante (AOAC, 2000) :

$$CF = \frac{3160}{\epsilon}$$

Avec 3160 correspond à la valeur de  $\epsilon$  de la solution H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et  $\epsilon$  est la valeur moyenne d'absorbance molaire des trois solutions ( $\epsilon$  (moy)) qui est égale à 3036,66 (AOAC, 2000).

Le facteur de correction du spectrophotomètre utilisé est égal à 1,04. Ainsi, le spectrophotomètre est convenable à la mesure des concentrations des solutions standards de mycotoxines.

### 2.4.2- Préparation des solutions standards

La préparation des solutions standards est réalisée selon les procédures décrites par le journal international de l'AOAC (2000). A cause de la toxicité des mycotoxines, la manipulation des standards doit être réalisée dans un laboratoire spécialisé en respectant toutes les précautions nécessaires (usage des gants, manipulation sous hotte..). Afin d'éviter la dégradation des toxines, des solutions diluées sont préparées immédiatement avant l'analyse par HPLC. Les solutions standards des mycotoxines ont été préparées en dissolvant 1 mg de l'AFB1, l'OTA et de la ZEN dans 1 ml de méthanol. Les valeurs de l'absorbance des

## Données expérimentales

solutions obtenues ont été déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre UV à 360, 333 et 274 nm, valeurs de longueurs d'ondes de l'absorbance sous UV correspondant respectivement à l'AFB1, l'OTA et la ZEN. Le calcul de la concentration de chaque mycotoxine est effectué en utilisant les coefficients d'extinction molaire  $\epsilon$  : 21 800, 5 440 et 13 900 mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, qui correspondent respectivement à l'AFB1, l'OTA et la ZEN (AOAC, 2000), suivant la formule suivante (AOAC, 2000) :

$$[\mu\text{g d'AFB1/ml}] = \frac{(A \times PM \times CF \times 1000)}{\epsilon}$$

PM : poids moléculaire de la mycotoxine

$\epsilon$  : coefficient d'extinction molaire (mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)

A : D.O lue sur spectrophotomètre

CF : facteur de correction du spectrophotomètre

Les valeurs des coefficients d'extinction molaire et des concentrations correspondant aux trois mycotoxines sont présentées dans le **tableau 10**.

**Tableau 10 : Valeurs des coefficients d'extinction molaire ( $\epsilon$ ), des poids moléculaires, des concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) et des longueurs d'ondes d'absorbance sous U.V (nm) de l'AFB1, l'OTA et la ZEN**

mycotoxine	Longueur d'onde (nm)	$\epsilon$ (mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	Poids moléculaire	Concentration
<b>AFB1</b>	360	21800	312	3,48
<b>OTA</b>	333	5440	403	15,17
<b>ZEN</b>	274	13900	318	18,25

La stabilité de la solution mère a été vérifiée par spectrophotomètre et toutes les gammes étalons de travail ont été préparées immédiatement avant l'emploi par dilution de la solution mère dans du méthanol. Une série d'étalons allant de 0,5 à 150 ng/ml pour l'AFB1 et l'OTA, et de 50 à 400 ng/ml pour la ZEN a été préparée par dilution de la solution mère dans du méthanol.

### 2.5- Confirmation de présence de l'OTA

La confirmation de la présence de l'OTA dans les échantillons de sorgho positifs est réalisée suivant une méthode enzymatique basée sur la dégradation de l'OTA par la carboxypeptidase et sa transformation en phénylalanine et en  $\alpha$ -OT qui sera détectée par HPLC. La technique est la suivante: une aliquote, prise à partir de l'extrait purifié d'un

## *Données expérimentales*

échantillon où l'OTA a été détectée par HPLC, puis séchée. Le culot a été dissous dans 975  $\mu$ l d'une solution tampon de 0,04 M de Tris-HCl, 1 M de NaCl, pH 7,5. Ensuite, 25  $\mu$ l de carboxypeptidase (100 U/ml de H<sub>2</sub>O) ont été ajoutés et le mélange a été incubé à température ambiante pendant une nuit. L'échantillon a été analysé dans les mêmes conditions chromatographiques de HPLC tel qu'il est utilisé pour la détection de l'OTA dans les échantillons. Le pic de l'OTA a disparu alors que le pic de  $\alpha$ -OT est apparu. L'  $\alpha$ -OT est quantifiée à partir de l'aire du pic et en utilisant une gamme d'étalons de solutions standards.

### **2.6- Confirmation de la présence de l'AFB1**

La confirmation de la présence de l'AFB1 dans les échantillons positifs se fait par un ajout de 200  $\mu$ l d'hexane et 50  $\mu$ l de TFA à l'extrait de l'échantillon. Le mélange est agité pendant 30 s puis laissé reposer 5 min pour que les phases se séparent. Un volume de 1,950ml du mélange eau/acétonitrile (10:90) a été ajouté et une agitation de 30 s a été effectuée, puis le mélange est laissé reposer 10 min afin que les deux phases se séparent. Enfin, la phase inférieure est injectée. Les conditions de HPLC sont les mêmes utilisées pour la détection de l'AFB1 dans les échantillons.

### **2.7- Méthode d'analyse simultanée de l'AFB1 et de l'OTA**

#### **2.7.1- Extraction et purification**

Les échantillons sont analysés selon la méthode de Nguyen et al. (2007). L'AFB1 et l'OTA sont extraites du sorgho par un mélange aqueux d'acétonitrile et de chlorure de potassium. Ainsi, 20g de sorgho sont broyés et extraits avec 100ml du mélange acétonitrile/chlorure de potassium (4%) (9 :1) dont le pH a été ajusté à 1,5 avec de l'acide chlorhydrique. Le mélange est agité pendant 20 min puis filtré sur un papier filtre. Le filtrat est purifié par ajout de 100ml d'hexane. La solution est mélangée dans un agitateur pendant 10 min. Après séparation, la phase supérieure (hexane) est rejetée alors que la phase inférieure subit deux autres purifications avec 50ml d'hexane. La phase inférieure est extraite avec 100ml d'un mélange de chloroforme et d'eau déionisée (50 :50) et mélangée pendant 10 min. Après séparation, la phase inférieure (chloroformique) est recueillie dans un ballon à col rodé. La phase supérieure est re-extraite deux fois avec 25ml de chloroforme et 25ml d'eau déionisée. A chaque fois, la phase organique (inférieure) est récupérée dans le ballon après séparation. Les extraits chloroformiques récupérés sont évaporés dans un évaporateur rotatif à 40°C à vitesse moyenne pour concentrer les mycotoxines. Le ballon est lavé par la suite avec

## *Donées expérimentales*

2ml du méthanol de qualité HPLC pour re-dissoudre les mycotoxines. La suspension est filtrée via un filtre de l'ordre de 0,45µm puis séchée sous jet d'azote. Pour l'analyse par HPLC, 500µl de méthanol sont ajoutés au résidu.

### **2.7.2- Les conditions de HPLC**

La détermination de l'AFB1 et de l'OTA est réalisée par la séparation des composants de la solution injectée dans un chromatographe de type Waters (Milford, MA, USA) muni d'une colonne de gel de silice C18 (eau Spherisorb 3 µm ODS2 4,6 x 150 mm, Milford, MA, USA) en phase inverse, suivie d'une détection par fluorescence (AFB1 :  $\lambda_{exc} = 365$  nm et  $\lambda_{em} = 440$ nm ; OTA :  $\lambda_{exc} = 335$ nm et  $\lambda_{em} = 465$ nm) (Waters 2475 détecteur de fluorescence, Waters, Milford, MA, USA). Le système est exécuté sous mode isocratique. La phase mobile est constituée de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,33 M)/acétonitrile/propanol-2-ol (650/400/50) et elle est injectée avec un débit de 0,5 ml/min. Le volume d'injection est de 50 µl et les temps de rétention de l'OTA et de l'AFB1 sont respectivement 14 et 56 min.

## **2.8- Méthode d'analyse de la ZEN**

### **2.8.1- Extraction et purification**

Les échantillons sont analysés selon la méthode officielle AOAC 985,18. Ainsi, 50g de sorgho sont broyés et mélangés avec 25g de diatomite et 20ml d'eau déionisée. Le mélange est extrait avec 250ml de chloroforme pendant 30 min. Après filtration, le filtrat est mélangé avec 10ml d'une solution saturée de NaCl et 50ml de NaOH à 2% puis agité vigoureusement pendant 5 min. Après séparation, la phase inférieure et le sédiment sont rejetés alors que la phase aqueuse est ré-extraite avec 50 ml de chloroforme pendant 1 min. Après le débarras de la phase organique (inférieure), la phase aqueuse est mélangée avec 50ml d'une solution d'acide citrique (106 g/l) et 50ml de dichlorométhane pendant 5 min. La phase inférieure est récupérée dans un ballon à col rodé à travers 40 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et un peu de laine de verre. La phase aqueuse a été ré-extraite avec 50ml de dichlorométhane. La couche de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> est lavée avec 10 à 15ml de dichlorométhane, pour éviter des pertes de substance à analyser. Les extraits récupérés dans le ballon sont évaporés dans un évaporateur rotatif pour concentrer la mycotoxine puis le résidu est ré-suspendu dans 3ml dichlorométhane. La suspension est séchée sous jet d'azote puis redissoute dans 500µl de la phase mobile avant de l'analyser par HPLC.

## *Donées expérimentales*

### **2.8.2- Les conditions de HPLC**

La détermination de la ZEN a été effectuée en utilisant une colonne de gel de silice C18 en phase inverse, suivie d'une détection de fluorescence ( $\lambda_{exc}= 274\text{nm}$ ;  $\lambda_{em}= 455\text{nm}$ ). La phase mobile est constituée d'acétonitrile/eau MilliQ (60:40) dont le pH est ajusté à 3,2 avec de l'acide acétique avec un débit de 1 ml/min. Le volume d'injection est de 100  $\mu\text{l}$ . Le temps de rétention est de 5,1 min et la température de la colonne est de 40°C.

### **2.9- Méthode de validation**

La normalisation de la technique comporte la détermination des différents critères de validation qui sont la linéarité, la limite de détection (LOD), la limite de quantification (LOQ), le temps de rétention, la répétabilité, la reproductibilité et le pourcentage de recouvrement (Thompson et al., 2002). D'une façon générale, la limite de détection correspond à la plus petite teneur de la molécule pouvant être détectée c'est-à-dire qui produit un signal détectable, différent de celui produit par un blanc (bruit de fond) avec une incertitude acceptable (0,13%) et la limite de quantification correspond à la plus petite teneur de la molécule pouvant être quantifiée avec une incertitude acceptable (0,05%). Il existe trois approches permettant d'estimer les limites de détection et de quantification qui s'adaptent à diverses situations : détermination du blanc, étude de la linéarité et approche graphique (Norme NF V03-110). Au cours de notre travail, nous avons choisi de déterminer LOD et LOQ en utilisant l'étude de la linéarité. Ainsi, la pente et l'écart-type de l'ordonnée à l'origine sont calculés à partir de la droite de linéarité de l'étalon. Les valeurs de LOD et LOQ sont déterminés en utilisant 3,3 et 10 fois la déviation standard divisée par la pente de la courbe d'étalonnage de chaque toxine. Les facteurs multiplicatifs 3,3 et 10 correspondent respectivement aux risques 0,13 et 0,05% de conclure à la présence ou l'absence de la mycotoxine recherchée.

Le pourcentage de recouvrement (Rc) ou le taux de récupération permet de vérifier l'efficacité de la méthode d'analyse par addition de quantités bien déterminées des mycotoxines étudiées à quelques échantillons afin d'obtenir une concentration connue de la mycotoxine dans les grains de sorgho. Par la suite, le calcul du rapport entre la teneur initiale de la mycotoxine dans l'échantillon et celle trouvée après extraction et analyse par HPLC nous permet d'évaluer la validité de la méthode et son efficacité pour le type de matrice étudiée.

## *Donées expérimentales*

A l'échelle internationale, les résultats doivent répondre aux exigences de la législation d'Union Européenne (Nos. 472/2002 et 26/2002) qui stipule que pour des solutions de teneurs de toxines entre 1 et 10ng/g, les récupérations de 70-110% sont acceptables. L'écart-type relatif doit être inférieur à 20%. Le taux de récupérations de la technique déterminé par l'évaluation du rapport entre la concentration finale de la mycotoxine après quantification par HPLC et la concentration initiale connue (contamination provoquée par fortification d'un aliment témoin par une quantité connue de la mycotoxine).

L'expression du taux de récupérations est le suivant (Zinedine, 2004) :

$$Rc = \frac{(Cm (\text{éch fortifié}) - Cm (\text{éch témoin}))}{C (\text{fortification})} \times 100$$

$Cm$  (éch fortifié) : concentration moyenne de l'échantillon après fortification.

$Cm$  (éch témoin) : concentration initiale de l'échantillon avant fortification.

$C$  (fortification) : quantité de mycotoxine ajoutée pour la fortification de l'échantillon.

Trois échantillons de sorgho analysés préalablement par HPLC et prouvés exempts de mycotoxines ont été utilisés au cours de ce travail pour la détermination du pourcentage de recouvrement et des paramètres de précision. La linéarité est représentée par la courbe d'étalonnage déterminée avec des concentrations standards de mycotoxines injectées en triple. La précision est calculée en termes de répétabilité intra-jour RSDr (n=3) et reproductibilité inter-jour RSDR (5 jours) à différents niveaux de fortification 0,5, 5 et 10 ng/g pour l'AFB1 et l'OTA et à 25, 50 et 100 ng/g pour la ZEN. Il faut obtenir un bon coefficient de corrélation pour s'assurer que la reproductibilité est nette et que la répétabilité est acceptable. La répétabilité :  $R = 2,8 \times$  écart-type dans les conditions de répétabilité. Le temps de rétention varie en fonction du pH, de la composition de la phase mobile, du débit, de la pression et de la température.

La déviation standard ou l'écart-type des 5 mesures effectuées pour chaque échantillon fortifié permet d'évaluer la dispersion des mesures autour de la concentration moyenne (Zinedine, 2004).

$$\sigma = \frac{\sqrt{\sum(Ci - Cm)^2}}{n-1}$$

$Ci$  : concentration de la mycotoxine déterminée après l'analyse  $i$ .

$Cm$  : concentration moyenne de la mycotoxine calculée suite aux cinq essais effectués.

$N$  : nombre d'essais réalisés.

## *Donées expérimentales*

Le coefficient de variation permet de vérifier la reproductibilité de la méthode pour les échantillons fortifiés. Ce coefficient est calculé comme suit (Zinedine, 2004) :

$$Cv = \frac{\sigma}{cm} \times 100$$

L'identification des pics a été réalisée avec des temps de rétention obtenus après injection de chaque solution standard séparément dans les mêmes conditions. La détermination quantitative a été accomplie en appliquant l'équation d'étalonnage ( $y = ax + b$ ).

### **2.10- Analyse statistique**

Les distributions normales de la teneur en toxines, les moyennes, les valeurs de déviations standards et les données de validation ont été analysées en utilisant le logiciel Statgraphics Centurion (XVII.I français). Une analyse de variance, en utilisant Statgraphics Centurion, (test ANOVA) a été utilisée pour déterminer la signification statistique des différences entre les deux lots d'échantillons (sorgho tunisien et sorgho importé de l'Egypte), avec  $P < 0,05$  étant acceptée comme significative.

## **3- Résultats et discussion**

### **3.1- Validation des méthodes d'analyses**

Il a été prouvé que la méthode d'analyse simultanée d'AFB1 et de l'OTA et celle de la ZEN sont rapides, sélectives et reproductibles. La phase mobile utilisée a permis une bonne séparation l'AFB1 et de l'OTA. L'identification des pics a été effectuée par comparaison des temps de rétention obtenus par injections séparées de chaque solution de la gamme d'étalons de chacune des trois mycotoxines dans les mêmes conditions. Les caractéristiques de performance ont été établies ; des courbes d'étalonnage sont linéaires de 10 à 150 ng/ml pour AFB1, de 25 à 150 ng/ml pour OTA et de 200 à 400 ng/ml pour la ZEN. Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) des trois mycotoxines sont présentées dans le **tableau 11**.

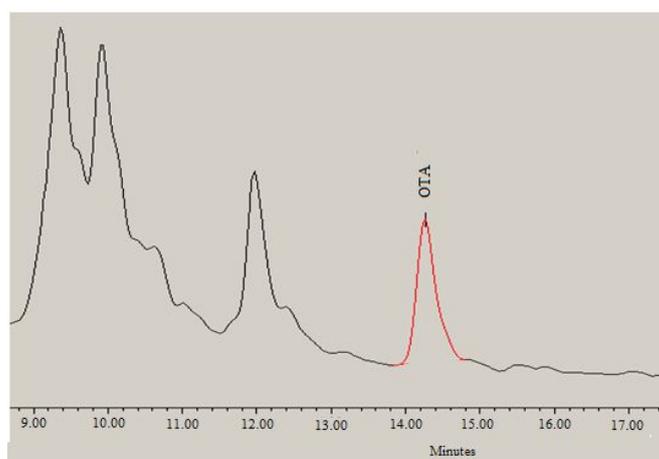
**Tableau 11 : Valeurs de LOD et LOQ pour l'AFB1, l'OTA et la ZEN**

	<b>AFB1</b>	<b>OTA</b>	<b>ZEN</b>
<b>LOD (ng/g de sorgho)</b>	0,008	0,03	3,1
<b>LOQ (ng/g)</b>	0,02	0,09	9,39

## Donées expérimentales

En utilisant la même méthode d'analyse simultanée de l'AFB1 et de l'OTA dans les céréales, différentes valeurs de LOD et LOQ ont été trouvées. Molinié et al. (2005) ont obtenu des valeurs de LOD et LOQ de l'OTA égales à 0,05 et 0,2 ng/g. Alors que Nguyen et al. (2007) ont rapporté des valeurs de LOD et LOQ de l'AFB1 égales à 0,7 et 0,22 ng/g.

Les paramètres de performances des deux méthodes utilisées sont résumés dans le **tableau 12**. Les taux de recouvrement (Rc) varient entre 78,12% et 90,51%. Les paramètres de précision, RSDr et RSDR sont relativement faibles et compris entre 0,07 et 7,39. Des chromatogrammes clairs avec des pics bien symétriques ont été obtenus à partir des échantillons naturellement contaminés (**Figure 15**). Les deux méthodes utilisées sont donc adaptées à la détection des mycotoxines étudiées dans le sorgho.



**Figure 15 : Exemple d'un chromatogramme d'un échantillon contaminé par de l'OTA**

**Tableau 12 : Valeurs des pourcentages de recouvrement (Rc), des déviations standard et des coefficients de variation des méthodes d'analyse de l'AFB1, l'OTA et la ZEN**

Mycotoxine	Taux de fortification	Moyenne Rc	RSDr	RSDR	Cv
AFB1	0,5	79,74	0,08	0,06	20,01
	5	84,2	0,51	0,38	12,11
	10	87,01	0,62	0,62	7,12
OTA	0,5	84	0,07	0,07	16,66
	5	79,01	0,67	0,58	16,95
	10	90,51	0,52	0,5	5,74
ZEN	25	78,12	1,83	1,95	9,36
	50	77,99	2,77	2,52	7,11
	100	82,77	7,39	6,96	8,92

Rc : Taux de recouvrement  
RSDR : reproductibilité inter-jour  
RSDr : répétabilité intra-jour  
Cv : coefficient de variation

## Données expérimentales

### 3.2- Incidence de l'AFB, l'OTA et la ZEN

L'analyse de variance par test ANOVA de l'influence du pays d'origine sur l'incidence et la concentration des mycotoxines dans les échantillons étudiés a montré qu'il n'y a aucune différence significative ( $P>0,05$ ) entre les deux lots d'échantillons pour chacune des trois mycotoxines étudiées.

Les valeurs de l'incidence de chaque mycotoxine, les fréquences des échantillons dépassant les limites fixées par la CE et les valeurs moyennes des teneurs en mycotoxines sont résumées dans le **tableau 13**.

**Tableau 13 : Incidence de l'AFB1, l'OTA et la ZEN dans les échantillons de sorgho**

	Origine	Incidence (%)	Intervalle	Cm	> limite (%)
<b>AFB1</b>	Egypte (27)	59,26 (16)	0,05-31,7	2,32±1,29	11,11 (3)
	Tunisie (37)	59,46 (22)	0,03-9,48	1,24±0,34	16,22 (6)
	Total (64)	59,37 (38)	0,03-31,7	1,71±0,57	14,06 (9)
<b>OTA</b>	Egypte (27)	40,74 (11)	0,14-16,44	2,06±0,79	22,22 (6)
	Tunisie (37)	35,14 (13)	1,04-27,8	1,71±0,76	13,51 (5)
	Total (64)	37,5 (24)	1,04-27,8	1,85±0,55	17,18 (11)
<b>ZEN</b>	Egypte (27)	29,63 (8)	6,08-31,18	6,62±1,42	0
	Tunisie (37)	35,14 (13)	3,75-64,52	8,56±2,15	0
	Total (64)	32,81 (21)	3,75-64,52	7,74±1,37	0

Incidence (%) : pourcentage des échantillons positifs

Intervalle : la plus basse et la plus haute teneur en mycotoxine dans les échantillons positifs

Cm : concentration moyenne de la mycotoxine

>limite : incidence des échantillons positifs dépassant la limite fixée par la CE

Nos résultats montrent que le sorgho commercialisé en Tunisie est contaminé par l'AFB1. Les échantillons positifs représentent 59,37% (38 parmi 64 échantillons) avec des teneurs allant de 0,03 à 31,7 ng/g et une valeur moyenne de 1,71±0,57ng/g. Parmi les échantillons positifs, seulement 9 (14,06%) contiennent une teneur en AFB1 supérieure à celle fixée par la CE (2 ng/g). Nos résultats ne sont pas en accord avec ceux trouvés par d'autres chercheurs. En effet, Ghali et al. (2010) ont rapporté que 73,4% des échantillons de sorgho ont été contaminés par l'AFB1 avec des taux allant de 0,4 à 25,1 ng/g. Dans une précédente étude, la teneur maximale en AFB1 a atteint 52,9 ng/g (Ghali et al., 2009a).

Le sorgho est considéré comme un substrat idéal pour la sécrétion des aflatoxines. Depuis 1978, Winn et Lane ont démontré que les aflatoxine B1 et B2 peuvent être produites dans le sorgho par *A.flavus* avec des quantités variables de 1 à 65ng/g après une incubation de 48 h à 25°C et 90% d'humidité relative (Winn & Lane, 1978).

## *Données expérimentales*

Au Brésil, l'AFB1 a été détectée dans le sorgho pré et post-fermenté utilisés pour l'alimentation des bovins de boucherie. Le niveau de contamination a augmenté de manière significative dans les échantillons de sorgho après ensilage (Keller et al., 2012). Silva et al. (2000) ont constaté que 12,8% des échantillons de grains de sorgho en provenance du Brésil ont été contaminés par l'AFB1 à des niveaux allant de 7 à 33 µg/kg et seulement 4,5% du total des échantillons dépassent le niveau maximal admissible pour les aflatoxines au Brésil (20 µg/kg). En Ethiopie, Ayalew et al. (2006) ont montré que 6,1% des échantillons de sorgho sont AFB1 positifs avec une concentration moyenne de 5,9 µg/kg. D'autres chercheurs n'ont pas détecté l'AFB1, en dépit de l'isolement d'*A. flavus* dans les 46 échantillons de malt de sorgho étudié (Nkwe et al., 2005). L'occurrence naturelle de l'aflatoxine B1 dans le sorgho cultivé en Inde a été étudiée par Ratnavathi et al. (2011). Ces chercheurs ont montré que 73% des échantillons sont positifs pour l'AFB1, mais seulement 0,75% des échantillons contiennent de la toxine au dessus de la limite de sécurité. Au Soudan, des incidences supérieures à 20% ont été observées dans le sorgho provenant de plusieurs régions du pays (Elbashir & Ali, 2013). Selon Silva et al. (2000), l'AFB2, l'AFG1 et l'AFG2 ne sont pas détectées dans les grains de sorgho.

Nos résultats ont montré que l'OTA a été détectée dans 37,5% des échantillons (24 parmi les 64 échantillons) avec des concentrations allant de 1,04 à 27,8ng/g et une concentration moyenne de  $1,85 \pm 0,55$ ng/g. Seuls 11 échantillons (17,18%) contiennent un niveau d'OTA au-dessus de la limite de sécurité (3 ng/g). L'UE autorise un niveau maximum d'OTA de 3 ng/g dans les céréales destinées à la consommation humaine (CEC, 2006a). Néanmoins, des niveaux beaucoup plus élevés ont été trouvés dans certains échantillons de maïs et de sorgho (Ayalew et al., 2006). D'autre part, l'UE a également établi des valeurs de référence pour les produits alimentaires à base de céréales et les produits destinés à l'alimentation animale de 250 µg/kg (CEC, 2012). Ghali et al. (2009b) ont montré que 51% des échantillons de sorgho ont été contaminés par l'OTA avec des niveaux compris entre 0,11 et 33,8 ng/g et une teneur moyenne de 5,4 ng/g. Alors que Zaid et al. (2009) ont montré que 38% des échantillons de sorgho tunisien sont contaminés par l'OTA avec une concentration moyenne de 117 ng/g. Maaroufi et al. (1995) ont montré la contamination de plusieurs produits alimentaires fréquemment consommés en Tunisie par l'OTA. Elbashir et Ali (2013) ont observé une faible incidence d'OTA (3,3%) dans le sorgho et les produits dérivés prélevés de différentes régions du Soudan.

## Données expérimentales

Nos résultats ont montré que ZEN a été détecté dans 32,81% (21 parmi 64 échantillons). La concentration de la ZEN varie entre 3,75 et 64,52 ng/g et la valeur moyenne est de  $7,74 \pm 1,37$  ng/g. Aucun échantillon n'est contaminé par un niveau de ZEN supérieure à la limite de sécurité (100ng/g). Il y a très peu de travaux publiés sur la contamination du sorgho par la ZEN dans le monde. Shotwell et al. (1980) ont détecté la ZEN dans 28% des échantillons de sorgho récolté aux Etats Unis à des concentrations comprises entre 200 et 6900  $\mu$ g/kg. Bagneris et al. (1986) ont signalé la présence de ZEN dans les cinq échantillons analysés à des concentrations de 47 à 1280  $\mu$ g/kg. Au Japon, l'incidence de la ZEN dans le sorgho est d'environ 52,5% avec des teneurs comprises entres 60 et 7260  $\mu$ g/kg (Aoyama et al., 2009). Dans certains pays africains, la consommation de boissons alcoolisées à base de sorgho est très courante. Cependant, le processus de fermentation n'affecte guère la contamination des produits à base de sorgho par la ZEN. Au Botswana, des fréquences élevées de ZEN ont été signalées dans la bière, le moût et le malt produits à partir des grains de sorgho (David et al., 2005). Au Soudan, la ZEN n'a pas été détectée dans les échantillons de sorgho (Elbashir & Ali, 2013).

### 3.3- Co-occurrence des mycotoxines

Au cours de ce travail, nous avons montré que l'AFB1, l'OTA et la ZEN contaminent le sorgho, et **peuvent aussi co-exister à cause de la diversité de la flore fongique de cette céréale (tableau 14).**

**Tableau 14 : Co-occurrence de l'AFB1, l'OTA et la ZEN dans les échantillons de sorgho**

	Incidence de la co-occurrence des mycotoxines (%)			
	AFB1-OTA	AFB1-ZEN	OTA-ZEN	AFB1-OTA-ZEN
<b>Egypte</b>	37,03	18,51	11,11	11,11
<b>Tunisie</b>	34,32	27,03	16,22	13,51
<b>Total</b>	29,68	23,43	14,06	12,5

Ainsi, 12,5% des échantillons analysés sont contaminés par les trois mycotoxines. D'ailleurs, des travaux antérieurs ont montré aussi la co-occurrence de l'AFB1, l'OTA et la ZEN dans des échantillons de grains de sorgho. Ghali et al. (2008) ont constaté que 58,8% des échantillons de sorgho contiennent de l'AFB1 à un taux de 1,5 à 41,4 ng/g et une moyenne de 11,6 ng/g, 52,9% des échantillons de sorgho contiennent de l'OTA avec des niveaux allant de 2,5 à 36,4 ng/g et une concentration moyenne de 14,4 ng/g. Ces mêmes chercheurs ont montré

## *Donées expérimentales*

que seulement 23,5% des échantillons de sorgho sont contaminés par la ZEN dans un intervalle de 7,3 à 14 ng/g et une moyenne de 10,9 ng/g. Ils ont rapporté également que la fréquence de co-occurrence d'AFB1, OTA et ZEN dans le sorgho est de 23,5%. La co-occurrence de l'AFB1, l'OTA et la ZEN peut avoir lieu dans d'autres denrées alimentaires tels que l'orge, les épices et le blé (Ghali et al., 2008). Sangare-Tigori et al. (2006) ont montré que 86% des échantillons de riz, de maïs et d'arachides de la Côte d'Ivoire sont contaminés par l'AFB1, l'OTA, la ZEN et la fumonisine B1.

### **4- Conclusion**

Les deux méthodes utilisées pour l'extraction et l'analyse par HPLC de l'AFB1, l'OTA et la ZEN ont été prouvées sensibles et reproductibles pour la détection et le dosage de ces mycotoxines dans les grains de sorgho. La détermination des paramètres de validation a montré de bons taux de récupération pour les trois mycotoxines. Les résultats obtenus ont montré que le sorgho commercialisé dans le marché tunisien est contaminé par l'AFB1, l'OTA et la ZEN. Nous avons remarqué la co-occurrence de ces trois mycotoxines dans quelques échantillons. La comparaison de nos résultats avec ceux obtenus par d'autres chercheurs a montré que l'incidence et les teneurs des mycotoxines dans le sorgho varient d'un pays à un autre et d'une année à une autre. **Ceci pourrait être expliqué par la variation de la composition de la mycobiota selon les conditions climatiques, l'utilisation des pesticides ou les différences génétiques entre les variétés du sorgho.** La détermination de la composition de la mycobiota de ces échantillons de sorgho permet d'identifier les espèces responsables de la production des mycotoxines détectées ainsi que leur incidence et leur capacité de produire les toxines étudiées.

**Chapitre III : Profils écophysiologicals des espèces *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tubingensis* et *Fusarium incarnatum* : influence des facteurs abiotiques sur la croissance et l'accumulation des mycotoxines dans les grains de sorgho**

**1- Introduction**

Dès la découverte de l'OTA, *Aspergillus ochraceus* appartenant à la section *circumdati* et *Penicillium verrucosum* ont été considérés au début les espèces connues productrices de cette toxine (Hesseltine et al., 1972 ; Pitt, 1987). Si *Penicillium verrucosum* est considéré comme le plus fréquemment associé aux céréales des climats tempérés, les espèces d'*Aspergillus* section *Circumdati* sont rencontrées couramment dans le climat chaud et tropical (Pitt & Hocking, 1997). Toutefois, leur incidence et leur présence naturelle dans les denrées alimentaires n'expliquent pas le niveau de contamination élevé dans divers aliments. D'autres espèces appartenant à la section *circumdati* ont été également décrites comme productrices d'OTA : *Aspergillus steynii* et *Aspergillus westerdijkiae* (Frisvad et al., 2004). Les *Aspergillus* section *nigri* sont, dans le monde des champignons, les plus impliqués dans la détérioration des produits alimentaires. L'importance des Aspergilli noirs en tant que producteurs d'OTA a pris plus de considération depuis la première description de la production d'OTA par *Aspergillus niger* var. *niger* (Abarca et al., 1994) et *Aspergillus carbonarius* (Horie, 1995). Il est maintenant considéré que, dans plusieurs produits alimentaires tels que les raisins et le vin, la contamination par l'OTA est principalement due à *A. carbonarius* et certaines espèces d'*A. niger* aggregates (Abarca et al., 2001). Le groupe *Niger* comprend 10 espèces bisériées, par exemple *A. brasiliensis*, *A. acidus* et *A. neoniger*. Toutefois, seul *A. niger* est connu pour être en mesure de produire de l'OTA (Varga et al., 2011). *A. niger* et *A. tubingensis* sont morphologiquement difficiles à distinguer et sont toutes les deux appelées communément *A. niger* ou *A. niger aggregate*. Ces deux espèces ont été récemment distinguées par leur capacité de produire l'OTA. Cependant, la production de l'OTA par l'ensemble *A. niger* est peu commune et ne dépassant pas 1 à 2% des isolats malgré son incidence élevée par rapport à *A. carbonarius* (Heena et al., 1998 ; Chiotta et al., 2011). Plusieurs études ont été menées sur la capacité de produire l'OTA par *A. tubingensis*. Le pourcentage des isolats producteurs varient entre 4,2 et 64,3% (Chiotta et al., 2011 ; Lasram et al., 2012 ; Spadaro et al., 2012). En outre, les études menées jusqu'à maintenant sur

## *Donées expérimentales*

l'effet des facteurs environnementaux sur le niveau d'OTA produit dans divers substrats ont été axées principalement sur *A. ochraceus* (Pardo et al., 2004) et *P. verrucosum* (Lindblad et al., 2004 ; Cairns-Fuller et al., 2005 ; Czaban et al., 2006). Dans le cas des Aspergilli noirs, les études ont signalé l'influence des conditions environnementales sur la production d'OTA par *A. carbonarius* dans les pistaches (Marin et al., 2008), les grains de café (Joosten et al., 2001) et le milieu synthétique à base de raisin (Marin et al., 2006 ; Lasram et al., 2010). Cependant, Esteban et al. (2004 ; 2006) ont étudié l'effet de l'activité de l'eau sur la production d'OTA par des espèces d'*Aspergillus niger* aggregates dans les milieux CYA et YES. Les travaux réalisés sur la production d'OTA dans des substrats naturels par des espèces d'*A. niger* ont été effectués dans les graines d'arachide et le maïs (Astoreca et al., 2009a, 2009b ; Alborch et al., 2011). Néanmoins, la contribution d'*A. tubingensis* dans la contamination du sorgho par l'OTA demeure inconnue.

Les Fusaria sont souvent impliqués dans la contamination de plusieurs plantes économiquement importantes telles que les céréales. La contamination des produits agricoles par *Fusarium* spp. est souvent un processus additif, qui commence dans le champ et augmente potentiellement au cours de la récolte, le séchage et le stockage (CAST, 2003). Les espèces du genre *Fusarium* sont reconnues comme étant les plus importantes mycètes pathogènes aux plantes dans le monde (Nelson et al., 1983) et représentent le groupe de champignons ayant le plus grand nombre d'espèces toxigènes (Haschek & Haliburton, 1986). Dans les régions tempérées, les Fusaria sont les plus impliqués dans la contamination des denrées alimentaires par les mycotoxines (Creppy, 2002). Les espèces de *Fusarium* les plus fréquemment isolées dans les climats tempérés sont : *F. graminearum* et *F. moniliforme* suivies par *F. culmorum*, *F. proliferatum* et *F. equiseti* (Sohn et al., 1999).

Le complexe *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) représente un groupe de 30 espèces morphologiquement similaires mais phylogénétiquement distinctes (O'Donnell et al., 2009, 2012), réparties uniformément en 2 sous-groupes désignés *incarnatum* et *equiseti*.

*Fusarium equiseti* est souvent détecté dans les céréales norvégiennes (Kosiak et al., 2005), dans les céréales des régions tempérées d'Europe et d'Amérique du Nord (Marasas et al., 1984) et dans les céréales et résidus de cultures des prairies canadiennes (Fernandez et al., 2008), mais elle est aussi commune en Europe du Sud (Logrieco et al, 2003), en particulier en Espagne (Jurado et al., 2006 ; Marin, 2010). Les métabolites secondaires produits par *Fusarium equiseti* varient en volume et en toxicité. Cette espèce produit les trichothécènes, la

## *Donées expérimentales*

buténolide, la beauvéricine, l'équisetine (EQ), la fusarochromanone (FUSCHR) et la zéaralénone (ZEN) (Kosiak et al., 2005 ; Leslie & Summerell, 2006).

*Fusarium incarnatum* est extrêmement répandu dans les régions tropicales et subtropicales, mais aussi détecté dans la région de la méditerranée et occasionnellement dans les régions tempérées (Leslie & Summerell, 2006). *F. incarnatum* est responsable de la production de moniliformine, trichothécènes et la zéaralénone. *Fusarium incarnatum* est souvent associé aux grains de sorgho en Inde (Sharma et al., 2011 ; Divakara et al., 2013) et en Argentine (Gonzalez et al., 1997). Aoyama et al. (2009) ont indiqué que le sorgho est une source importante de contamination par la ZEN à cause de la forte présence de *F. semitectum*. Schroeder et al. (1975) ont démontré que la contamination du sorgho par la ZEN aux États-Unis est liée à des fortes infections par *F. roseum 'gibbosum'* et *F. roseum 'semitectum'*. *F. semitectum* est fréquemment détecté dans les grains de sorgho (Lincy et al., 2011) et de tissus végétaux en provenance de régions plus chaudes (Leslie et al., 1990). Cependant, Shotwell et al. (1980) ont rapporté que *F. equiseti* est présent dans des échantillons de sorgho contaminés par la zéaralénone et que ces isolats sont capables de produire la mycotoxine dans la culture de maïs concassé. À ce jour, on a réalisé des travaux de recherches sur l'effet des facteurs environnementaux sur la croissance fongique et la production de mycotoxines de plusieurs espèces de *Fusarium* tels que *F. graminearum*, *F. verticillioides* et *F. proliferatum* mais aucun travail n'a été réalisé sur *F. incarnatum*.

L'effet des facteurs biotiques et abiotiques sur la croissance et la production d'AFB1 par *Aspergillus flavus* a été largement étudié grâce à la modélisation mathématique (Marin et al., 1998a ; Samapundo et al., 2007). Cependant, aucune étude n'est réalisée sur le sorgho.

Le but de ce travail est d'évaluer, dans des conditions de laboratoire, l'effet de l' $a_w$ , la température et le temps d'incubation sur la croissance fongique et la production de l'AFB1, l'OTA et la ZEN par *A. flavus*, *A. tubingensis* et *F. incarnatum*, inoculés dans les graines de sorgho.

## **2- Matériel et méthodes**

### **2.1- Souches utilisées**

Des isolats de chacune des trois espèces étudiées ont été utilisés au cours de ce travail : 3 isolats d'*Aspergillus flavus* (AF8, AF10 et AF14), 3 isolats d'*Aspergillus tubingensis* (AN1, AN28 et AN71) et 3 isolats de *Fusarium incarnatum* (F79, F86 et F115). Ces isolats ont été identifiés auparavant au cours de la caractérisation de la mycobiota. Leur identité a été

## *Donées expérimentales*

vérifiée par les outils moléculaires et leur capacité de produire l'AFB1, l'OTA ou la ZEN a été prouvée (voir chapitre I).

### **2.2- Conception expérimentale et analyse statistique**

Pour l'espèce *A. flavus*, un dispositif factoriel complet de 3 températures (15, 25 et 37°C), 6 activités d'eau (0,85, 0,88, 0,91, 0,94, 0,97 et 0,99  $a_w$ ) et 3 isolats (AF8, AF10 et AF14) est utilisé. La gamme d'activités d'eau testées pour l'espèce *A. tubingensis* varie entre 0,88 et 0,99  $a_w$ . Alors que pour l'espèce *F. incarnatum*, les activités d'eau testées sont : 0,91, 0,94, 0,97 et 0,99  $a_w$ . Les diamètres des colonies et la production de l'AFB1, l'OTA ou la ZEN après 7, 14, 21 et 28 jours sont les variables dépendantes. Trois répétitions pour chaque combinaison (T x isolat x  $a_w$ ) sont effectuées. Les effets de la température et de l'activité de l'eau sur la croissance du mycélium et la production des mycotoxines après 7, 14, 21 et 28 jours ont été étudiés statistiquement par analyse de variance (ANOVA) en utilisant Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics, Inc., Maryland, EE.UU.).

### **2.3- Préparation du sorgho**

L'étude a été réalisée *in vitro* sur les grains de sorgho. Pour déterminer le mode de croissance des trois espèces étudiées et de production de mycotoxines, différentes quantités d'eau, calculées à partir d'une courbe d'absorption d'humidité préalablement préparée pour le même sorgho utilisé, sont ajoutés à des sous-échantillons de 100g dans des bouteilles en verre. Le sorgho est incubé à 4°C pendant 48 h avec une agitation périodique. Une fois le sorgho a absorbé l'eau ajoutée, les bocaux en verre sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 min. Par la suite, des couches simples de grains de sorgho sont soigneusement et aseptiquement déposées dans des boîtes de pétri en plastique de 90 mm de diamètre sous une hotte à flux laminaire. Les niveaux finaux d' $a_w$ , ont été vérifiés par AquaLab 3 (Decagon Devices, Inc., WA, USA), avec une précision de  $\pm 0,003$ .

### **2.4- Préparation de l'inocula et incubation**

Les isolats d'*A. flavus* et *A. tubingensis* sont cultivés sur une gélose de PDA et incubés pendant 7 jours à 25°C afin d'assurer une sporulation significative. Après incubation, quelques conidies sont prélevées de chaque boîte avec une anse stérile puis suspendues dans 9 ml de solution aqueuse de Tween 80 à 0,05 %. Après homogénéisation, la concentration des spores a été déterminée à l'aide d'une cellule de Thoma. Ensuite, les suspensions sont diluées

## Donées expérimentales

afin d'ajuster les concentrations finales entre 1 et  $5 \cdot 10^5$  spores/ml. Trois boîtes de pétri de chaque combinaison (isolat x  $T^\circ$  x  $a_w$ ) sont inoculées au centre par une goutte de 5  $\mu$ l de la suspension diluée puis incubées pendant 28 jours. Des expériences antérieures ont montré que le nombre de spores inoculées par cette technique varie entre 10 à 100 spores.

Les isolats de *Fusarium incarnatum* ont été aussi cultivés pendant 7 jours sur un milieu CYA. Pour chaque combinaison  $a_w$  x  $T^\circ$  x isolat, trois boîtes de Pétri ont été inoculées en plaçant un disque de 5 mm de diamètre, coupé à l'aide d'un perce-bouchon stérile, au centre de la boîte. Les températures d'incubation pour les neuf isolats sont 15, 25 et 37°C. Les boîtes avec le même niveau de température et  $a_w$  sont empilées dans des chambres en plastique conjointement avec 250ml de solution de glycérol/eau du même niveau d' $a_w$  pour maintenir l'humidité relative à l'équilibre dans les chambres.

### 2.5- Mesure des diamètres des colonies et calcul de la vitesse de croissance

Les diamètres des colonies ont été déterminés quotidiennement pendant les 28 jours en mesurant les deux diamètres perpendiculaires de la colonie. Le taux ou la vitesse de croissance  $\mu$  (mm/jour) et la phase de latence  $\lambda$  (jours) ont été évalués pour chaque isolat des espèces *A. flavus* et *A. tubingensis* et à chaque combinaison  $T^\circ$  x  $a_w$  en traçant l'extension du diamètre de la colonie (mm) en fonction du temps (jours), par ajustement du modèle de Baranyi et Roberts (1993) en utilisant le logiciel Statgraphics Plus. Ce modèle permet de déterminer les 3 phases de croissance (une phase de latence, une phase exponentielle et une phase stationnaire). C'est un modèle primaire dont la forme générale est la suivante:

$$y = y_0 + \mu_{max} A - \ln \left( 1 + \frac{[\exp(\mu_{max} A) - 1]}{\exp(y_{max} - y_0)} \right)$$
$$A = t + \left( \frac{1}{\mu_{max}} \right) \ln [\exp(-\mu_{max} t) + \exp(-\mu_{max} \lambda) - \exp(-\mu_{max} t - \mu_{max} \lambda)]$$

Où  $y$  est le diamètre de colonie (ou rayon);  $y_0$  est le diamètre initial de la colonie (ou rayon), habituellement zéro;  $y_{max}$  est le diamètre maximal de la colonie (ou rayon) atteint, la valeur asymptotique;  $\mu_{max}$  est le taux de croissance spécifique maximal (il est défini comme la pente de la courbe de croissance au niveau du point d'inflexion);  $\lambda$  est la période de latence (défini comme l'intersection de la ligne définissant le taux de croissance spécifique maximale avec l'axe des x); et  $t$  est le temps.

## *Données expérimentales*

Pour l'espèce *F. incarnatum*, le taux de croissance ( $\mu$ ) (mm/jour) a été calculé par un montage du modèle linéaire en utilisant Microsoft Excel.

### **2.6- Quantification de l'accumulation des mycotoxines**

L'AFB1 et l'OTA ont été analysées selon la méthode de Nguyen et al. (2007) (chapitre II). Leur quantification a été réalisée en utilisant un chromatographe Waters (Milford, MA, USA) avec une colonne C18 de gel de silice en phase inverse (eau Spherisorb 3  $\mu$ m ODS2 4,6 x 150 mm, Milford, MA, USA), suivie d'une détection par fluorescence ( $\lambda_{exc}$ = 362 nm;  $\lambda_{em}$ = 425 nm) (Waters 2475 détecteur de fluorescence, Waters, Milford, MA, USA). La phase mobile utilisée pour l'AFB1 est constituée d'un mélange d'eau/acétonitrile/méthanol (700: 170: 170) avec un débit de 1 ml/min. La limite de détection (LOD) de la méthode est de 0,075 ng/g. Le volume d'injection est égal à 10  $\mu$ l. Le temps de rétention est 8 min. Une dérivation post-colonne est réalisée en utilisant un réacteur photochimique pour une détection meilleure (PHRED) (LCTech UVE, Dorfen, Germany). Alors que pour la détermination de l'OTA, la phase mobile est constituée d'un mélange d'acétonitrile/eau/acide acétique (57/41/2). Le volume d'injection est de 25  $\mu$ l avec un débit de 1 ml/min et le temps de rétention de l'OTA est d'environ 7,1 min. La détection est réalisée par fluorescence a été ( $\lambda_{exc}$  = 330 nm et  $\lambda_{em}$  = 460 nm).

L'accumulation de la zéaralénone par les trois isolats de *Fusarium incarnatum* inoculé sur les grains sorgho a été analysée selon la méthode officielle AOAC 985,18 (chapitre I).

## **3- Résultats et discussion**

### **3.1- Profil écophysologique de l'espèce *Aspergillus flavus***

#### **3.1.1- Influence de l'activité de l'eau et de la température sur la croissance mycélienne**

La **figure 15** représente un exemple de l'évolution des diamètres (cm) de colonies observées pour les isolats AF10, AF8 et AF14 à deux activités d'eau (0,90 et 0,97) et à deux températures (25 et 37°C) en fonction du temps. Les courbes sont obtenues par l'ajustement des données de trois répétitions de chaque combinaison (T x  $a_w$  x isolat) par le modèle de Baranyi. Dans des conditions optimales de croissance, les diamètres des colonies augmentent linéairement jusqu'à ce que les colonies atteignent le bord des boîtes de Pétri (**figure 16**), alors que dans des conditions limitantes, un temps de latence bien visible est observé avant que la croissance ne commence (**figure 17**).

## Donées expérimentales

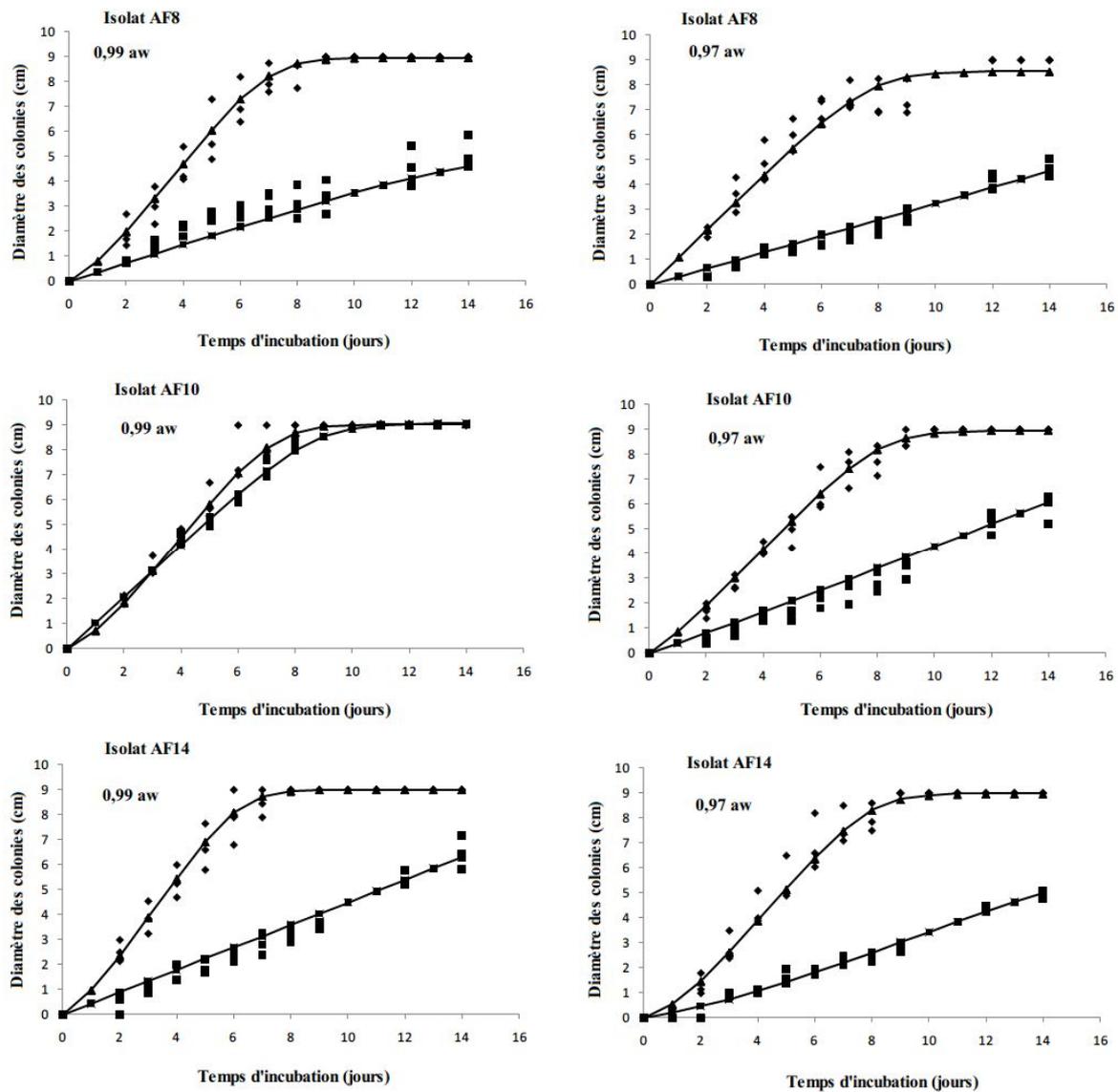
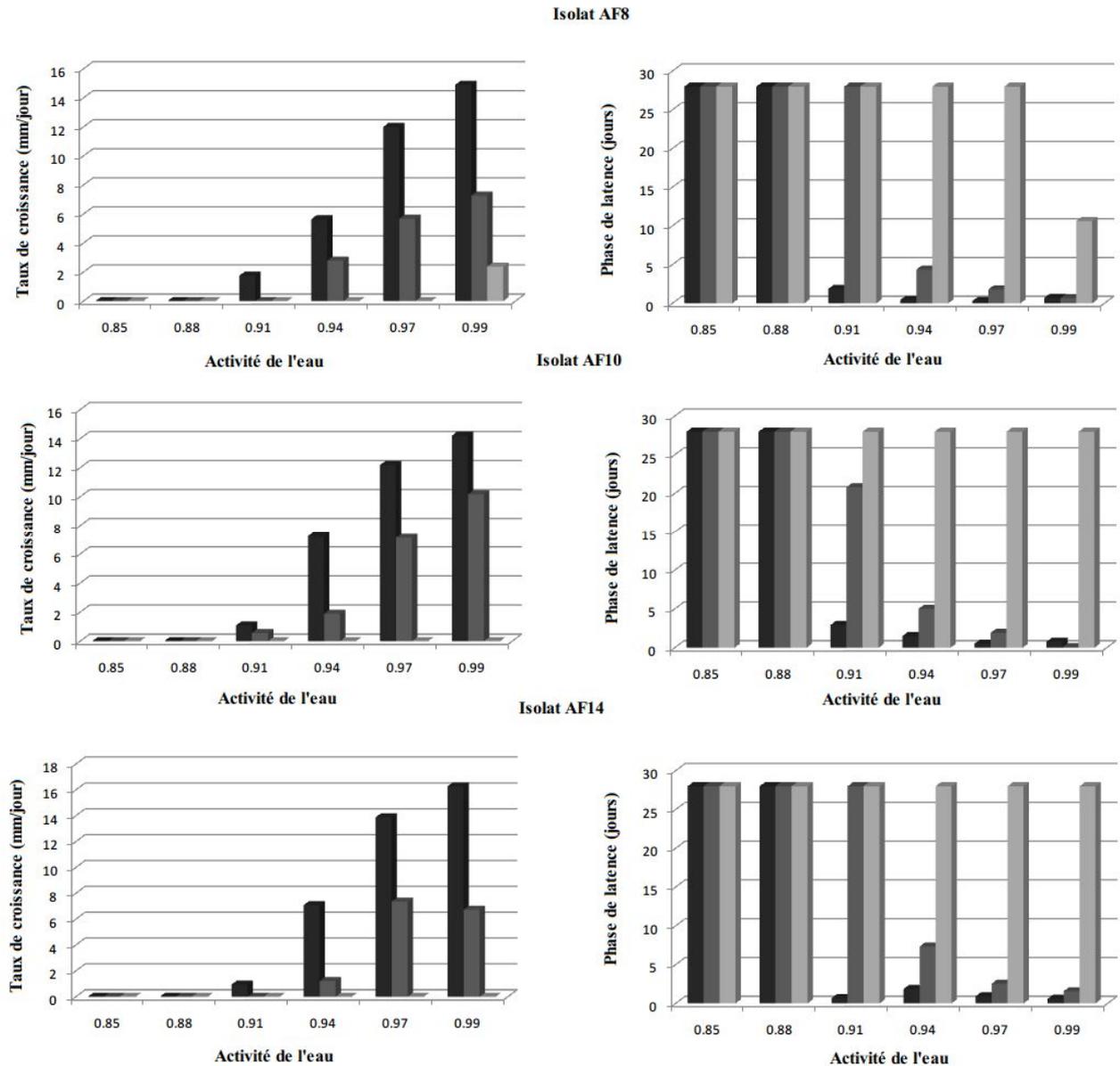


Figure 16 : Représentation de l'ajustement par le modèle de Baranyi de 3 répétitions des diamètres des colonies de 3 *A. flavus* cultivés sur les grains de sorgho en fonction du temps à 37 (◆) et 25 °C (■) et à 0,99 et 0,97 a<sub>w</sub>

## Donées expérimentales



**Figure 17 : Effet de la température et de l'activité de l'eau sur le taux de croissance (mm/jour) et la phase de latence des trois isolats d'*Aspergillus flavus* cultivés sur les grains de sorgho à 37°C (■), 25°C (▒) et 15 °C (□)**

L'analyse de variance par test ANOVA a révélé que les facteurs  $a_w$ , température, temps d'incubation, isolat ainsi que leurs interactions présentent une influence très significative sur la croissance du mycélium d'*A. flavus* ( $P < 0,0001$ ) (tableau 15).

L'analyse de variance pour le taux de croissance ( $\mu$ ) (tableau 16) a montré que les facteurs simples  $a_w$ , température et leurs interactions (isolat x température,  $a_w$  x température et isolat x  $a_w$  x température) ont une influence significative sur la vitesse de croissance ( $p < 0,05$ ).

## Donées expérimentales

D'une manière générale, les 3 isolats se comportent de façon similaire comme l'a souligné Mohale et al. (2013) pour les souches d'*Aspergillus flavus* qui sont soit aflatoxinogènes ou non.

**Tableau 15 : Analyse de variance de l'effet de la température, de l'activité de l'eau et de leurs interactions sur la croissance radiale de 3 isolats d'*Aspergillus flavus* cultivés dans les grains de sorgho**

Facteurs	Degré de liberté	Carré moyen	Valeur de F	Probabilité
Isolat	2	2,69	18,75	**
$a_w$	5	18,55	128,96	**
T°	2	50,89	353,77	**
Temps d'incubation	1	3007,49	20904,39	**
Isolat x $a_w$	10	1,04	7,24	**
Isolat x T°	4	21,73	151,08	**
Isolat x Temps d'incubation	2	3,96	27,54	**
$a_w$ x T	10	14,63	101,73	**
$a_w$ x Temps d'incubation	5	591,7	4112,77	**
T° x Temps d'incubation	2	1102,43	7662,77	**
Isolat x $a_w$ x T°	20	1,93	13,48	**
Isolat x $a_w$ x Temps d'incubation	10	1,74	12,14	**
$a_w$ x T° x Temps d'incubation	10	223,91	1556,35	**
Isolat x $a_w$ x T° x Temps d'incubation	20	2,7	18,79	**

\*\*significatif (P<0,0001)

$a_w$  = activité de l'eau

T° = température

**Tableau 16 : Analyse de variance de l'effet de la température, de l'activité de l'eau et de leurs interactions sur la vitesse de croissance de 3 isolats d'*Aspergillus flavus* cultivés dans les grains de sorgho**

Facteurs	Degré de liberté	Carré moyen	Valeur de F	Probabilité
Isolat	2	0,003	0,17	ns
$a_w$	5	6,55	322,4	**
T°	2	9,14	449,69	**
Isolat x $a_w$	10	0,016	0,81	ns
Isolat x T°	4	0,059	2,93	*
$a_w$ x T°	10	1,89	93,27	**
Isolat x $a_w$ x T°	20	0,38	1,91	*

ns : non significatif

\*significatif (P<0,05)

\*\*significatif (P<0,0001)

## *Donées expérimentales*

Le modèle de Baranyi a été utilisé pour déterminer deux paramètres de croissance : les phases de latence  $\lambda$  (jours) et les taux de croissance  $\mu$  (mm/j). Le coefficient  $R^2$ , qui correspond au pourcentage de variance exprimé par ce modèle mathématique et obtenu pour les différents traitements (combinaisons), varie entre 85,85% et 99,83%, avec 31 combinaisons NG (No growth = pas de croissance) et seulement 2 combinaisons parmi les 54 sont inférieures à 90% (**tableau 17**). Les valeurs faibles des erreurs (entre 0,017 et 0,673) et les valeurs élevées de  $R^2$  (de 85,85 à 99,83%), comme on le remarque dans **le tableau 17**, montrent que le modèle utilisé permet de déterminer d'une manière nette les paramètres de croissance de nos isolats d'*Aspergillus flavus*.

*Données expérimentales*

**Tableau 17 : Les valeurs des coefficients R<sup>2</sup> (%) et des erreurs obtenues par développement du modèle du Baranyi pour trois *Aspergillus flavus* cultivés sur les grains de sorgho pour chaque condition testée**

Isolat	T (°C)	0,85 a <sub>w</sub>		0,88 a <sub>w</sub>		0,91 a <sub>w</sub>		0,94 a <sub>w</sub>		0,97 a <sub>w</sub>		0,99 a <sub>w</sub>	
		R <sup>2</sup> (%)	Erreur										
AF10	15	N.G											
	25	N.G		N.G		97,86	0,673	89,55	0,033	98,96	0,027	99,76	0,027
	37	N.G		N.G		94,01	0,021	98,96	0,037	99,48	0,06	99,11	0,108
AF8	15	N.G		97,78	0,017								
	25	N.G		N.G		N.G		98,48	0,025	98,56	0,031	98,21	0,038
	37	N.G		N.G		96,019	0,026	97,64	0,044	99,159	0,088	98,92	0,131
AF14	15	N.G											
	25	N.G		N.G		N.G		85,85	0,022	97,40	0,045	99,14	0,037
	37	N.G		N.G		95,94	0,02	96,30	0,069	99,64	0,041	99,83	0,023

N.G=No growth (pas de croissance)

R<sup>2</sup>= coefficient

## Données expérimentales

Les effets combinés de l' $a_w$  et de la température sur les taux de croissance (mm/j) des trois isolats testés sont présentés dans **la figure 17**. Les taux de croissance maximaux atteints sont 16,29, 14,91 et 14,22 mm/j respectivement pour les isolats AF14, AF8 et AF10, à 37°C et à 0,99  $a_w$ . Dans cette étude, la température optimale pour la croissance est 37 °C pour tous les niveaux d' $a_w$  testés (figure 16). La température 25°C est également très favorable et permet d'obtenir des vitesses de croissance élevées. Des résultats similaires pour *A. flavus* ont été mentionnés par Horn (2005) qui a montré que la mesure de la colonisation des graines par *Aspergillus* section *flavi* augmente avec l'augmentation de l'activité de l'eau et de la température jusqu'à atteindre les conditions optimales de 0,96  $a_w$  et 37°C. Par contre, la température optimale pour la croissance obtenue dans notre étude (37°C) est plus élevée que celle observée par Marin et al. (1998a) pour *A. flavus* (30°C) cultivé sur un milieu d'extrait de maïs. Samapundo et al. (2007) ont montré qu'*A. flavus* a une croissance optimale dans le maïs à 30°C. Schindler et al. (1967) ont rapporté que la croissance d'*A. flavus* est plus favorisée à une température allant de 29 à 35°C dans la gélose du moût.

Les températures comprises entre 25 et 37°C n'ont pas été testées dans notre étude, mais, **l'extension du mycélium des isolats d'*A. flavus* de la Tunisie est significativement plus élevée à 37°C qu'à 25 °C ( $p < 0,05$ )**. Dans notre étude, on peut observer d'après la **figure 16** qu'à des températures élevées (25 et 37°C) et d' $a_w$  (0,97 et 0,99  $a_w$ ), de très courtes phases de latence ont été obtenues. On peut également remarquer à partir de la **figure 17**, que l' $a_w$  la plus élevée (0,99) est ajustée à la vitesse de croissance la plus importante et à la période de latence la plus courte et ceci pour les isolats AF10 et AF8 à 25°C et pour l'isolat AF14 à 37°C. Contrairement à nos résultats, Samapundo et al. (2007) ont montré que l'augmentation de température de 30 à 37°C a entraîné une diminution des taux de croissance des colonies et une augmentation de la durée de la phase de latence et qu'à toutes les températures étudiées, plus la valeur d' $a_w$  du maïs est élevée plus le taux de croissance de la colonie est important et plus la phase de latence est courte pour tous les isolats, donnant lieu à des taux de croissance les plus rapides et des phases de latence plus courtes ont été rencontrées à 30°C et à 0,982  $a_w$  pour tous les isolats.

Les extensions les plus faibles du mycélium ont été observées à 15°C, avec une croissance nulle enregistrée pour tous les trois isolats à toutes les activités d'eau à l'exception pour l'isolat AF8 qui a pu germer et proliférer à 0,99  $a_w$ . En fait, la croissance à 15°C n'est pas fréquente et ne se produit qu'à des valeurs maximales d' $a_w$ . Le taux de croissance minimum observé est de 0,9 mm/jour, calculé pour l'isolat AF14 à 37°C et à 0,91  $a_w$ . A

## *Données expérimentales*

l'exception de l'isolat AF10, aucune croissance n'est observée à 25°C et à 0,91 a<sub>w</sub>. Cependant, à 37°C, tous les isolats ont proliféré à 0,91 a<sub>w</sub>. Afin de déterminer le niveau minimal d'a<sub>w</sub> permettant la croissance, les deux valeurs 0,85 et 0,88 a<sub>w</sub> ont été testées dans la présente étude prouvant l'absence de croissance du mycélium, après 28 jours pour tous les isolats et à toutes les températures. Cependant, Pitt et Miscamble (1995) ont rapporté que l'activité d'eau minimale pour la croissance d'*A. flavus* est comprise entre 0,80 et 0,83. **Ces différences entre les résultats obtenus au cours de notre étude et ceux mentionnés par d'autres chercheurs peuvent être dues à des différences de la structure des milieux et de la disponibilité des nutriments.** Des études similaires ont également indiqué que la structure des milieux de culture et la disponibilité des nutriments peut affecter les chances de croissance à des valeurs marginales d'a<sub>w</sub> (Pardo et al., 2004). Dans notre étude, nous avons utilisé les grains de sorgho qui peuvent avoir une disponibilité des nutriments inférieure à celle des milieux de culture synthétiques à cause de la structure du grain (par exemple la paroi du grain qui représente une barrière physique). Une autre explication possible est que certains composants de la couche de péricarpe du grain comme les tanins et les niveaux élevés de pigments à base de phénol ainsi que certaines protéines antifongiques peuvent affecter la croissance fongique grâce à la résistance à l'infestation par les champignons que ces composés peuvent acquérir à la plante (Seetharaman et al., 1996 ; Rodriguez Herrera et al., 1999).

Les taux de croissance maximums ont été observés pour les trois isolats à 37 et 25°C et à 0,97 et 0,99 a<sub>w</sub>. **Le taux de croissance est significativement plus élevé à 37°C x 0,99 a<sub>w</sub> (P <0,0001) qu'à 25°C x 0,99 a<sub>w</sub>.** La croissance de l'isolat AF14 est plus importante à 0,97 a<sub>w</sub> x 25°C qu'à 25°C x 0,99 a<sub>w</sub>. Des résultats similaires ont été rapportés par Marin et al. (1998a) pour *A. flavus* cultivé sur une gélose à base d'extrait de maïs où l'a<sub>w</sub> optimale pour la croissance est 0,994. Cependant, l'activité de l'eau optimale pour la croissance dans certaines études diffère de celle observée dans notre travail. Contrairement à nos résultats, Horn (2005) a constaté que l'activité de l'eau optimale pour la croissance est de 0,96 a<sub>w</sub>. **Ces différences peuvent être attribuées à la variabilité intraspécifique et régionale entre les souches.**

Des comparaisons ont été faites pour la croissance de trois isolats d'*A. flavus*. Aucun isolat ne croit nettement plus rapide ou plus lent que les autres dans toutes les conditions testées.

## *Données expérimentales*

### **3.1.2- Influence de l'activité de l'eau et de la température sur l'accumulation de l'AFB1**

L'AFB1 est le seul métabolite pris en compte dans l'analyse des données, car l'AFB2 est rarement détectée et ceci seulement à l'état de traces, alors que les aflatoxines G1 et G2 n'ont jamais été détectées. Une situation similaire a été rapportée par Giorni et al. (2011). La production d'AFB1 a été déterminée après 7 et 14 jours d'incubation pour des conditions optimales de croissance (25°C x 0,97 a<sub>w</sub>, 25°C x 0,99 a<sub>w</sub>, 37°C x 0,94 a<sub>w</sub>, 37°C x 0,97 a<sub>w</sub> et 37°C x 0,99 a<sub>w</sub>) et après 21 et 28 jours d'incubation pour des conditions favorables à la croissance, mais non optimales : (37°C x 0,91 a<sub>w</sub>, 25°C x 0,91 a<sub>w</sub>, 25°C x 0,94 a<sub>w</sub> et 15°C x 0,99 a<sub>w</sub>). Dans des conditions qui ne permettent pas la croissance (à 37 et 25°C pour les niveaux d'humidité 0,85 et 0,88 a<sub>w</sub> et à 15°C pour les niveaux d'a<sub>w</sub> 0,85, 0,88, 0,91, 0,94 et 0,97 a<sub>w</sub>), la production d'AFB1 n'a pas été déterminée (**tableau 18**).

**L'accumulation maximale de l'AFB1 (2,26 ng/g) a été détectée à 37°C x 0,99 a<sub>w</sub> chez l'isolat AF8 après 7 jours d'incubation (tableau 19).** Généralement, à 37°C et 25°C, qui sont des températures favorables à la croissance, l'accumulation de l'AFB1 augmente avec l'augmentation des activités d'eau (0,97 et 0,99 a<sub>w</sub>). Néanmoins, aucune différence significative n'a été trouvée entre 0,99 et 0,97 a<sub>w</sub> (P > 0,05) à 37°C après 7 jours d'incubation. A 37°C, des quantités significativement plus élevées d'AFB1 (P < 0,05) ont été produites par les 3 isolats d'*A. flavus* à 0,99 a<sub>w</sub>. **En effet, les conditions optimales pour la production d'AFB1 sont de 37 °C et 0,97- 0,99 a<sub>w</sub> (P < 0,05).**

Globalement, les conditions optimales d'humidité obtenues dans la présente étude, 0,97 et 0,99 a<sub>w</sub>, sont en accord avec les études précédentes suggérant que l'humidité relative optimale pour l'aflatoxinogénèse est comprise entre 97 et 99% déterminée dans les pistaches et les noisettes (Diener & Davis, 1966), 97% dans les noix stockées (0,99 a<sub>w</sub> n'a pas été testée) (Arrus et al., 2005) et 0,98 a<sub>w</sub> sur le paddy (Mousa et al., 2011). Toutefois, Montani et al. (1988a) ont constaté que l'a<sub>w</sub> la plus favorable à la production des aflatoxines est de 0,90 a<sub>w</sub> à toutes les périodes d'incubation étudiées. Dans cette étude, aucun isolat ne produit l'AFB1 à 0,94 a<sub>w</sub> sauf pour l'isolat AF8 qui a produit 0,23 ng/g, à 37°C après 7 jours d'incubation et 0,105 ng/g, à 25°C après 21 jours d'incubation.

*Données expérimentales*

**Tableau 18 : Concentration de l'AFB1 (moyenne + erreur) produite dans les grains de sorgho par trois *Aspergillus flavus* à 0,91, 0,94, 0,97 et 0,99 a<sub>w</sub> et à différentes températures après 7, 14, 21 et 28 jours.**

Isolat	T (°C)	0,91 a <sub>w</sub>		0,94 a <sub>w</sub>		0,97 a <sub>w</sub>			0,99 a <sub>w</sub>				
		21 j	28 j	7 j	14 j	21 j	28 j	7 j	14 j	7 j	14 j	21 j	28 j
AF8	37	< d.l	< d.l	0,23±0,34	< d.l			1,41±0,34	0,29±0,03	2,26±0,34	< d.l		
	25 15	N.G	N.G			0,105±0,02	< d.l	< d.l	0,203±0,02	0,35±0,19	< d.l	< d.l	< d.l
AF10	37	< d.l	< d.l	< d.l	< d.l			1,33±0,28	0,25±0,01	1,59±0,28	< d.l		
	25	< d.l	< d.l			< d.l	< d.l	< d.l	0,22±0,08	0,73±0,31	1,52±0,08		
AF14	15											N.G	N.G
	37	< d.l	< d.l	< d.l	< d.l			1,64±0,28	0,47±0,03	1,79±0,28	< d.l		
	25 15	N.G	N.G			< d.l	< d.l	< d.l	0,165±0,06	< dl	0,501±0,06	N.G	N.G

< d.l = inférieure à la limite de détection (0,075 ng/g); N.G = pas croissance

## Données expérimentales

Afin de trouver l' $a_w$  minimale permettant la production d'aflatoxine, les niveaux d'humidité 0,85, 0,88 et 0,91  $a_w$  ont été testés dans cette étude mais l'AFB1 n'a pas été détectée à 25 et 37°C pour tous les isolats, malgré que la croissance a été observée à 0,91  $a_w$  et 37°C. Ainsi, *Aspergillus flavus* produit l'AFB1 dans une gamme d'humidité plus étroite qu'à celle permettant la croissance (0,94 et 0,99  $a_w$ ). Par conséquent, il serait possible d'éviter la contamination des céréales par les aflatoxines en contrôlant l'humidité pendant le stockage ( $\leq 0,91 a_w$ ).

A 15°C, l'AFB1 n'a pas été détectée (tableau 19). Contrairement à nos résultats, Hunter (1969) a proposé 0,84  $a_w$  en tant que valeur minimale pour la production d'aflatoxine dans le maïs. Astoreca et al. (2012) a proposé 0,83  $a_w$  pour l'accumulation de l'AFB1 dans un milieu d'extrait de maïs.

Le test ANOVA des effets de la température et de l'activité de l'eau sur la production d'AFB1 par les trois isolats d'*A. flavus* a révélé que la température et l' $a_w$  ainsi que les interactions (température x isolats,  $a_w$  x temps d'incubation et température x temps d'incubation) ont un effet significatif sur la production d'AFB1 après 7 jours et 14 jours de culture sur les graines de sorgho ( $P < 0,05$ ) (tableau 19). Après 21 et 28 jours d'incubation, seuls les facteurs température et  $a_w$  et l'interaction entre l'activité de l'eau et les isolats affectent de manière significative l'accumulation de l'AFB1 ( $P < 0,05$ ) (tableau 20).

**Tableau 19 : Analyse de variance de l'effet de l'activité de l'eau et de la température sur la production de l'AFB1 par 3 isolats d'*Aspergillus flavus* après 7 et 14 jours d'incubation dans les grains de sorgho**

Facteurs	Degré de liberté	Carré moyen	Valeur de F	Probabilité
T°	1	6,45	46,87	**
$a_w$	2	4,75	34,49	**
Isolat	2	0,26	1,9	ns
temps d'incubation	1	0,41	3,03	ns
T° x isolat	2	0,81	5,94	*
T° x temps d'incubation	1	12,77	92,73	**
$a_w$ x isolat	4	0,2	1,48	ns
$a_w$ x Temps d'incubation	2	3,14	22,81	**
Isolat x temps d'incubation	2	0,21	1,54	ns
$a_w$ x isolat x temps d'incubation	4	0,15	1,14	ns

ns : non significatif

\*significatif ( $P < 0,05$ )

\*\*significatif ( $P < 0,0001$ )

## Données expérimentales

**Tableau 20 : Analyse de variance de l'effet de l'activité de l'eau et de la température sur la production de l'AFB1 par 3 isolats d'*Aspergillus flavus* après 21 et 28 jours d'incubation dans les grains de sorgho**

Facteurs	Degré de liberté	Carré moyen	Valeur de F	Probabilité
T°	2	0,028	5,26	*
a <sub>w</sub>	5	0,04	7,52	**
Isolat	2	0,0002	0,05	ns
temps d'incubation	1	0,012	2,28	ns
T° x isolat	4	0,003	0,67	ns
T° x temps d'incubation	2	0,003	0,63	ns
a <sub>w</sub> x isolat	10	0,011	2,20	*
Isolat x temps d'incubation	2	0,0006	0,12	ns

ns : non significatif  
\*significatif (P<0,05)  
\*\*significatif (P<0,0001)

A l'opposé de nos résultats, plusieurs chercheurs ont signalé un comportement différent d'*A. flavus* vis à vis la température optimale pour l'accumulation de l'AFB1 qui varie entre 25 et 30°C quel que soit le substrat (Diener & Davis, 1996 ; Arrus et al., 2005 ; Mousa et al., 2011). D'autre part, Montani et al. (1988a) ont montré que l'accumulation maximale des aflatoxines s'effectue à 30°C pour les différents niveaux a<sub>w</sub>. Cependant, Schindler et al. (1967) ont rapporté que la production maximale des aflatoxines sur les milieux à base de moût a eu lieu à 24°C. Contrairement à nos résultats, Rabie et Smally (1965) ont rapporté qu'il n'y a pas de production d'AFB1 à 36°C. Cependant, Schindler et al. (1967) ont constaté que la température optimale pour la production d'AFB1 est de 35°C. Dans notre étude, aucune température comprise entre 25 et 37°C n'a été étudiée, mais **une diminution significative de l'accumulation d'AFB1 a eu lieu lors de l'abaissement de la température de 37 à 25°C.**

La période d'incubation permettant une accumulation maximale en AFB1 dépend de la température, de l'activité de l'eau et de l'isolat testé. Dans les conditions optimales (37°C et 0,99 a<sub>w</sub>), tous les isolats nécessitent 7 jours pour atteindre le pic de production d'AFB1, alors que l'AFB1 n'a pas été détectée après 14 jours dans les mêmes conditions. A une valeur d'humidité au-dessus de 0,94 a<sub>w</sub>, l'AFB1 détectée à 37°C est plus faible après 14 jours d'incubation dans les grains de sorgho qu'après 7 jours avec une différence significative entre les deux périodes d'incubation (p<0,0001). Les résultats ont montré que la valeur optimale pour l'accumulation d'AFB1 à 25°C est 0,99 a<sub>w</sub>. A 25°C, les quantités d'AFB1 détectées à 0,97 et 0,99 a<sub>w</sub> après 14 jours d'incubation ont augmenté par rapport à celles produites après 7

## *Données expérimentales*

jours d'incubation, sauf pour l'isolat AF8 à 0,99  $a_w$  dont la quantité produite est plus importante après 7 jours d'incubation avec des différences significatives entre les 2 périodes d'incubation ( $P < 0,001$ ). La diminution de l'AFB1 après le pic de production a été observée dans des conditions optimales (37°C et 0,97-0,99  $a_w$ ). **La diminution de la concentration d'AFB1 pourrait être expliquée par sa dégradation par le champignon lui-même lorsque le substrat est épuisé** (Hamid & Smith, 1987). La détection d'AFB1 après 21 jours et 28 jours d'incubation a montré que seulement l'isolat AF8 produit l'AFB1 à 0,94  $a_w$  et à 37 et 25°C après 7 et 21 jours, respectivement.

Dans notre étude, la production maximale d'AFB1 ne pouvait pas être liée à un moment précis après l'inoculation, mais dans l'ensemble les conditions optimales pour la production d'AFB1 (37°C et 0,97-0,99  $a_w$ ), 7 jours d'incubation sont, en général, suffisant pour que *A. flavus* atteigne une accumulation importante d'AFB1. Néanmoins, la période d'incubation et la température optimale nécessaire à la production maximale de l'AFB1 sont, probablement, liées à l'ensemble des conditions testées, la nature et la composition du substrat et la variabilité intraspécifique et régionale entre les isolats.

**Dans notre étude, les conditions optimales de la croissance coïncident avec celles de la production d'AFB1 (0,99  $a_w$  et 37°C).** Cependant, d'autres études ont montré qu'une importante croissance peut se dérouler sans aucune production d'aflatoxines. Par exemple, Rabie et Smalley (1965) ont montré que la production maximale d'aflatoxines se produit à 24°C, mais la croissance maximale d'*A. flavus* a eu lieu entre 29 et 35°C. En étudiant la production d'AFB1 dans les arachides, Diener et Davis (1967) ont trouvé un optimum à 0,95  $a_w$  alors qu'aucune quantité importante d'aflatoxine n'a été trouvée à des valeurs égales ou inférieures à 0,85  $a_w$ . Il semble que dans chaque étude, *A. flavus* se comporte différemment, donc il peut y avoir d'autres facteurs impliqués, non seulement la température et l' $a_w$ . Medina et al. (2006) ont suggéré l'effet des facteurs climatiques et du changement climatique sur l'expression des gènes, la croissance et la production d'aflatoxine. Cela implique que ces différences entre les données obtenues par ces études menées dans les différents pays du monde sont dues à la colonisation de différentes souches, ce qui rend difficile de généraliser des méthodes pour contrôler ce champignon.

**Cette étude représente le premier travail réalisé sur l'effet de l'activité de l'eau et de la température sur la croissance et la production AFB1 par des souches tunisiennes d'*A. flavus* sur les grains de sorgho.** Nous devons signaler que des travaux antérieurs ont souligné que les résultats obtenus par des études réalisées sur les milieux de culture

## *Données expérimentales*

synthétiques concernant la production de mycotoxines ne peuvent pas être directement extrapolées aux substrats naturels (Garcia et al., 2011). Ainsi, l'intérêt de notre étude est qu'elle est réalisée directement sur les grains de sorgho.

Dans notre étude, la prédiction du taux de croissance et de la production maximale en aflatoxines n'est pas en accord avec les résultats expérimentaux et les données de la littérature. Dans cette étude, *A. flavus* prolifère et produit plus d'AFB1 à 37°C qu'à 25°C. Cependant, d'autres études ont montré que 30°C est la température optimale pour la croissance et la production d'aflatoxines. **Ces différences peuvent être attribuées à la variabilité intraspécifique et régionale entre les isolats. Par exemple, on peut voir que les souches tunisiennes auraient développé une tolérance au climat chaud et humide, ce qui pourrait expliquer le mieux la croissance et la production d'AFB1 qui sont favorisées par des valeurs élevées de température et d' $a_w$  chez ces isolats.** Les conditions optimales pour la production d'AFB1 et la croissance du mycélium sont de 0,99  $a_w$  et 37°C. Il n'y a pas de croissance et de production d'AFB1 chez *A. flavus* à 0,85 et 0,88  $a_w$  à toutes les températures étudiées. Par conséquent, il est possible d'éviter l'accumulation des aflatoxines en stockant le sorgho à des faibles activités d'eau ( $\leq 0,91 a_w$ ). Nos résultats ont montré que les souches tunisiennes d'*A. flavus* isolées à partir des grains du sorgho sont capables de croître dans un large éventail d'humidité (de 0,91 à 0,99  $a_w$ ) et de température (de 15 à 37°C), mais produisent l'AFB1 dans une gamme plus étroite (0,94 à 0,99  $a_w$  et de 25 à 37°C). Dans la gamme des activités d'eau évaluées au cours de cette étude, le niveau 0,94  $a_w$  est limitant pour la production de l'AFB1. Une étude sur les tendances de la croissance et de la production de l'AFB1 à différentes valeurs d'humidité et de température dans les graines de sorgho peut fournir des informations importantes sur la contamination du sorgho par l'AFB1. Elle pourrait expliquer, en partie, le risque de contamination de sorgho par l'AFB1 dans les régions avec des climats différents. **Notre étude a contribué à la compréhension de l'écologie et la physiologie de souches tunisiennes d'*A. flavus*. Toutefois, la capacité d'*A. flavus* pour produire l'AFB1 a été principalement étudiée à des valeurs constantes de températures et d'activités d'eau, tandis qu'en réalité, ces deux paramètres varient de façon importante au cours du temps. Ainsi, l'étude de l'effet des fluctuations sur la croissance et la production de la toxine serait d'un grand intérêt.**

## Données expérimentales

### 3.2- Profil écophysiological de l'espèce *Aspergillus tubingensis*

#### 3.2.1- Influence de l'activité de l'eau et de la température sur la croissance mycélienne

Le test ANOVA montre que les facteurs simples ( $a_w$ , température, temps d'incubation et isolat) ainsi que leurs interactions, influent significativement sur l'augmentation du diamètre des colonies ( $P < 0,0001$ ) (**tableau 21**). L'analyse de variance de l'influence des facteurs abiotiques sur le taux de croissance (mm/jour) montre que les facteurs simples ( $a_w$  et température), ainsi que les interactions (isolat x  $a_w$ ,  $a_w$  x températures et isolat x  $a_w$  x températures), influent significativement sur la vitesse de croissance ( $P < 0,05$ ) (**tableau 22**).

**Tableau 21 : Analyse de variance de l'effet de la température, de l'activité de l'eau et de leurs interactions sur la croissance radiale de 3 isolats d'*Aspergillus tubingensis* cultivés dans les grains de sorgho**

Facteurs	Degré de liberté	Carré moyen	Valeur de F	Probabilité
Isolat	2	29,89	41,98	**
$a_w$	4	72,67	102,07	**
T°	2	35,02	49,19	**
temps d'incubation	28	18,79	26,36	**
Isolat x $a_w$	8	42,71	59,98	**
$a_w$ x T°	8	9,42	13,23	**
Isolat x T°	4	11,24	15,80	**
Isolat x T° x $a_w$	16	10,61	14,91	**

$a_w$  : activité de l'eau

T° : température

\*\* : significatif ( $P < 0,000$ )

**Tableau 22 : Analyse de variance de l'effet de la température, de l'activité de l'eau et de leurs interactions sur la vitesse de croissance de 3 isolats d'*Aspergillus tubingensis* cultivés dans les grains de sorgho**

Facteurs	Degré de liberté	Carré moyen	Valeur de F	Probabilité
Isolat	2	0,09	2,40	n.s
$a_w$	4	14,73	396,00	**
T°	2	13,02	349,94	**
Isolat x $a_w$	8	0,09	2,54	*
Isolat x T°	4	0,08	2,28	n.s
$a_w$ x T°	8	2,62	70,44	**
Isolat x $a_w$ x T°	16	0,13	3,52	**

ns = non significatif

\* Significatif  $P < 0,05$

\*\*Significatif  $P < 0,0001$

## *Données expérimentales*

La **figure 18** est une représentation de l'évolution des diamètres des colonies des trois isolats en fonction du temps à trois températures différentes (15, 25 et 37°C) et à 0,97 et 0,99  $a_w$  par ajustement des données des trois répétitions avec le modèle de Baranyi. On remarque, à partir de la **figure 18**, que lorsque les conditions de croissance sont optimales, le diamètre des colonies augmente de façon linéaire jusqu'à atteindre le bord des boîtes de Pétri, alors que lorsque les conditions sont peu favorables, des phases de latence sont observées avant que le mycélium ne commence à envahir les grains sans atteindre les bords de la boîte même après 28 jours d'incubation. La **figure 19** représente la variation de la vitesse de croissance (mm/jour) et de la phase de latence (jours) en fonction de l'interaction entre l' $a_w$  et la température d'incubation des trois *A. tubingensis* cultivés dans les grains de sorgho.

## Données expérimentales

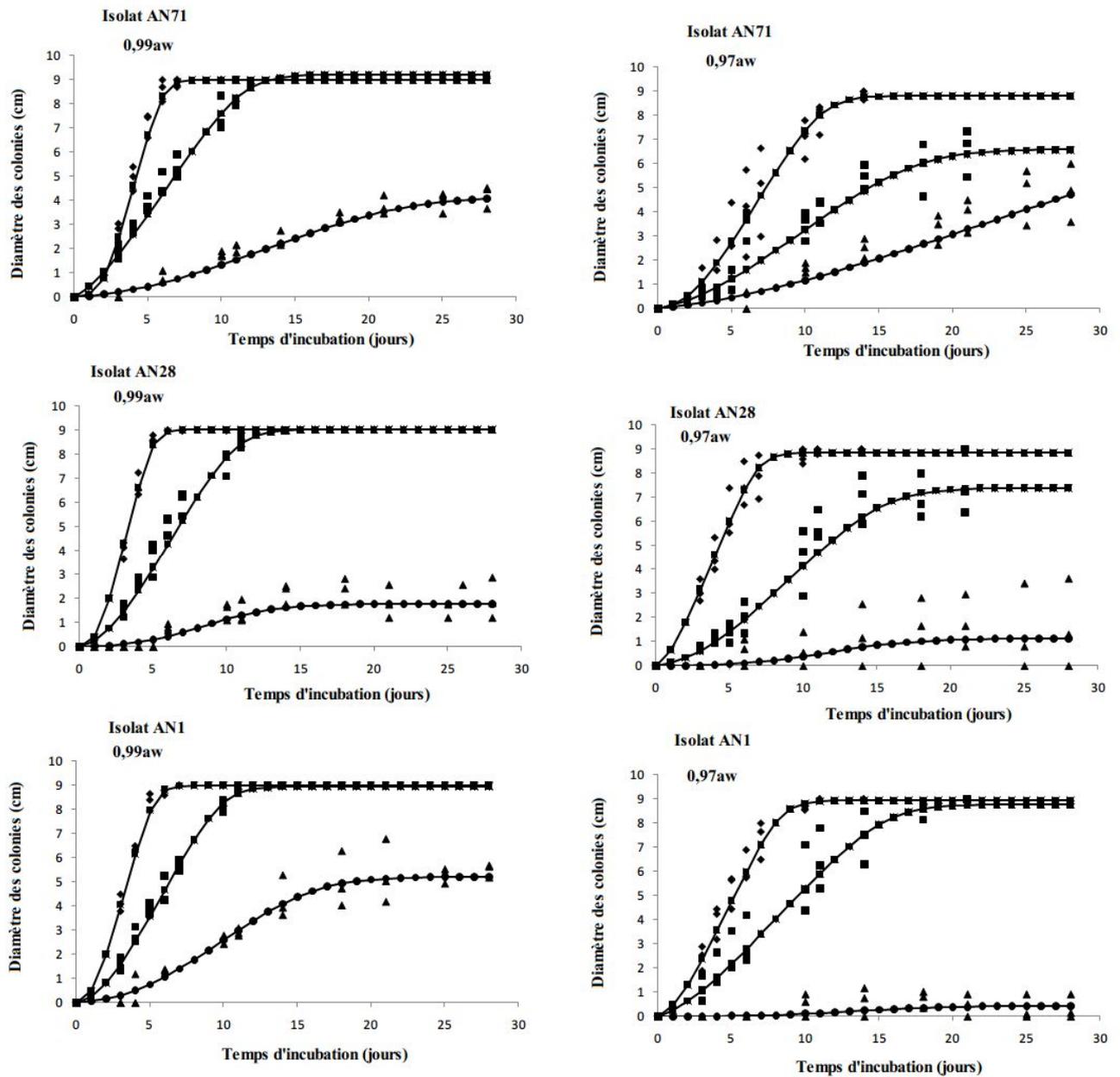
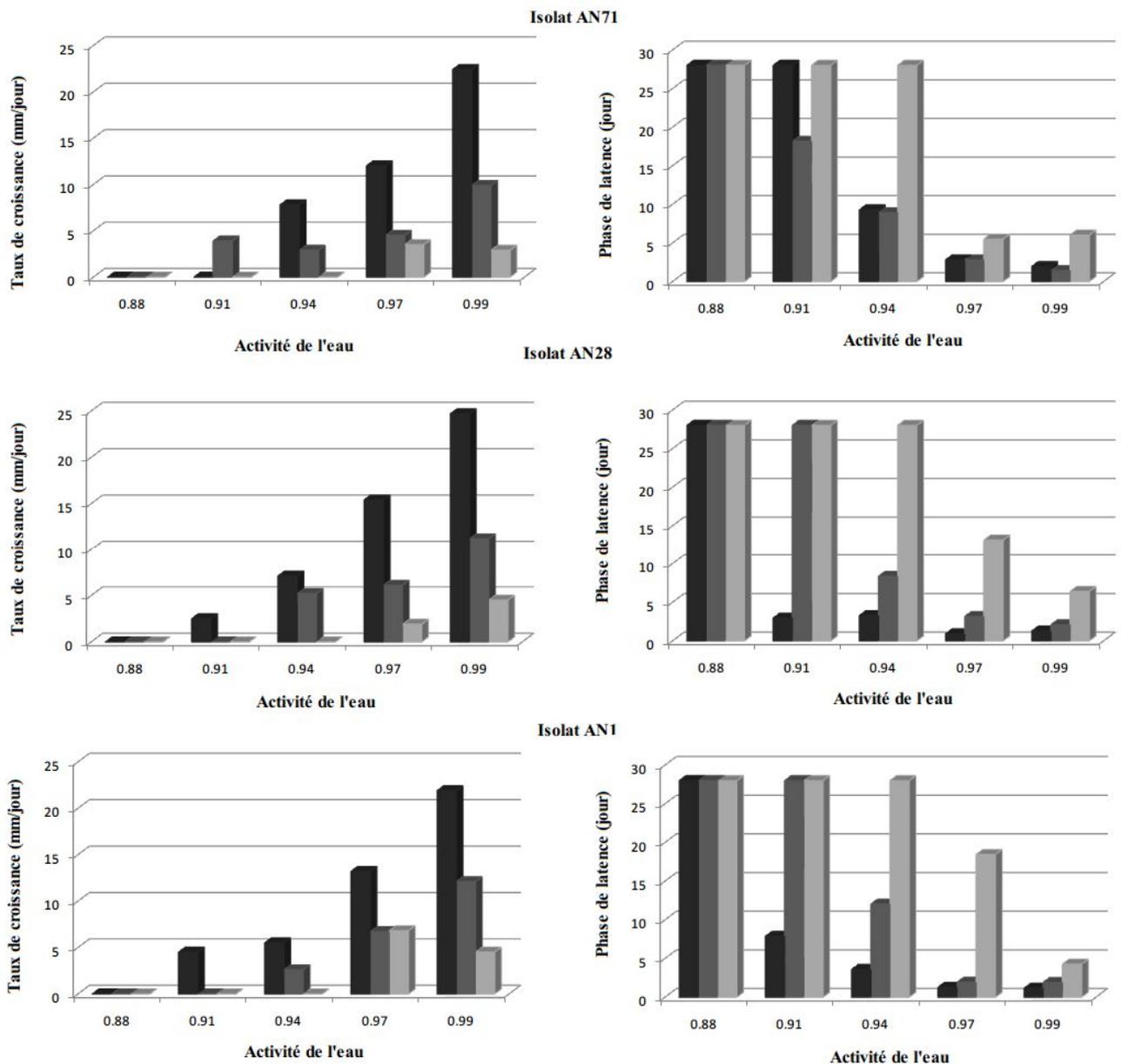


Figure 18 : Représentation de l'ajustement par le modèle de Baranyi de 3 répétitions des diamètres des colonies de 3 *A. tubingensis* cultivés sur les grains de sorgho en fonction du temps à 37 (◆), 25 (■) et 15 °C (▲) et à 0,99 et 0,97 a<sub>w</sub>

## Données expérimentales



**Figure 19 : Effet de la température et de l'activité de l'eau sur le taux de croissance (mm/jour) et la phase de latence des trois isolats d'*Aspergillus tubingenis* cultivés sur les grains de sorgho à 37 (■), 25 (■) et 15 °C (■)**

Le coefficient  $R^2$ , qui est le pourcentage de variance exprimé par le modèle mathématique, varie entre 96,63% et 99,95% avec 18 combinaisons NG (pas de croissance) parmi 45. Les valeurs faibles des erreurs (0,001 à 0,073) et les valeurs élevées des  $R^2$  (96,63 - 99,95) montrent que le modèle est suffisamment adéquat pour déterminer les paramètres de croissance (tableau 23).

*Données expérimentales*

**Tableau 23 : Les valeurs des coefficients R<sup>2</sup> (%) et des erreurs obtenues par développement du modèle du Baranyi pour trois *Aspergillus tubigenis* cultivés sur les grains de sorgho pour chaque condition testée**

Isolat	T (°C)	0,88 a <sub>w</sub>		0,91 a <sub>w</sub>		0,94 a <sub>w</sub>		0,97 a <sub>w</sub>		0,99 a <sub>w</sub>	
		R <sup>2</sup> (%)	Erreur								
AN71	15	N.G		N.G		N.G		99,25	0,018	98,99	0,027
	25	N.G		98,58	0,006	96,63	0,024	99,62	0,019	99,84	0,018
	37	N.G		N.G		98,15	0,011	99,69	0,026	99,88	0,018
AN28	15	N.G		N.G		N.G		98,92	0,015	98,72	0,009
	25	N.G		N.G		98,33	0,021	99,81	0,016	99,86	0,017
	37	N.G		99,35	0,021	99,39	0,073	99,82	0,021	99,93	0,007
AN1	15	N.G		N.G		N.G		99,45	0,001	98,80	0,067
	25	N.G		N.G		97,72	0,015	99,85	0,017	99,79	0,018
	37	N.G		99,50	0,017	99,4	0,045	99,88	0,014	99,95	0,006

N.G : no growth (pas de croissance)

## Données expérimentales

Généralement, les trois isolats se comportent de façon similaire. Les taux de croissance maximums obtenus au cours de cette étude sont 24,7, 22,4 et 21,9 mm/jour respectivement pour les isolats AN28, AN71 et AN1 à 37°C et à 0,99  $a_w$  (**figure 19**). L'étendue de la colonisation par *A. tubingensis* a augmenté de manière significative ( $P < 0,0001$ ) avec l'augmentation de l'activité de l'eau et de la température à des conditions optimales de 0,99  $a_w$  et 37°C. La valeur minimale d' $a_w$  pour la croissance des isolats d'*A. tubingensis* varie selon la température. L'activité de l'eau minimale permettant la croissance est de 0,91  $a_w$  pour les isolats AN1 et AN28, et de 0,94  $a_w$  pour l'isolat AN71 à 37°C. Cependant, à 25°C, seul l'isolat AN71 croît à 0,91  $a_w$ . Dans cette étude, la croissance à 15°C n'a eu lieu qu'à des niveaux élevés d' $a_w$  (0,97 et 0,99  $a_w$ ), bien qu'à cette température, la croissance a été très lente. Le taux de croissance minimal observé est de 1,9 mm/jour, calculé pour l'isolat AN28 à 15°C et 0,97  $a_w$  (**figure 19**). Des tendances similaires ont été observées par Marin et al. (1998b) qui ont signalé que la température et l' $a_w$  optimales pour la croissance d'*A. niger* sont 0,994 et 37°C et la croissance minimum a été observée à 0,90  $a_w$  et 15°C. Les conditions optimales pour la croissance d'*A. niger* cultivé sur d'autres substrats ont été rapportées par Leong et al. (2006) (0,98  $a_w$ , 35°C), Ayerst (1969) (1,0  $a_w$ , 35°C), Reiss (1986) (0,96 au 0,98  $a_w$ , 35-37°C) et Astoreca et al. (2007) (0,97  $a_w$  et 30°C). Selon Parra et Magan (2004), le taux de croissance optimale a été observé à 0,97  $a_w$  pour deux isolats d'*A. niger* cultivés sur le milieu MEA/glycérol modifié à 25, 30 et 35°C. De façon générale, nos résultats sont en accord avec ceux obtenus dans les études précédentes.

Afin de définir l' $a_w$  minimale permettant la croissance, la culture d'*A. tubingensis* a été testée à 0,88  $a_w$ . Aucun développement de mycélium n'a été observé à cette valeur d'humidité relative chez tous les isolats et à toutes les températures pendant 28 jours d'incubation. Cependant, d'autres chercheurs ont démontré qu'*A. niger* tolère des valeurs d' $a_w$  inférieures. Ainsi, l' $a_w$  minimale permettant la croissance pour *A. niger* varie entre 0,80 et 0,84  $a_w$  en fonction de la souche et de la température (Parra & Magan, 2004). Selon Astoreca et al. (2007), l' $a_w$  minimale permettant la croissance chez *A. niger* est de 0,85 à des températures supérieures à 30 °C.

On peut voir à partir de la **figure 19** que la valeur d'activité d'eau la plus élevée est ajustée à la vitesse de croissance la plus élevée et la phase de latence la plus courte est observée pour l'isolat AN71 à 37 et 25°C et à 0,99  $a_w$  et à 15°C et 0,97  $a_w$ , pour l'isolat AN28 à 25 et 15°C et 0,99  $a_w$  et pour l'isolat AN1 à 37 et 25°C à 0,99  $a_w$ . Cependant, le taux de croissance le plus élevé et la phase de latence la plus courte ne sont pas ajustés à la même

## *Données expérimentales*

valeur d' $a_w$  pour l'isolat AN28 à 37°C et pour isolat AN1 à 15°C. De courtes phases de latence (entre 0,9 et 3,15 jours) ont été détectées à 25- 37°C et 0,97- 0,99  $a_w$ . A des faibles disponibilités en eau, le temps de latence est considérablement important, en particulier lorsque la température chute de 37 à 15°C. Des tendances similaires ont été observées pour les trois isolats étudiés, bien que l'isolat AN28 semble grandir tôt à une faible valeur d' $a_w$  (2,94 jours à 0,91  $a_w$  et 3,26 jours à 0,94  $a_w$ ) lorsqu'il est incubé à 37°C. Astoreca et al. (2007) ont observé de très courtes phases de latence (<24 h) pour la croissance d'*A. niger* à 25- 30 °C à des  $a_w$  allant de 0,94 à 0,995  $a_w$ . Contrairement à notre étude qui est réalisée sur un substrat naturel de grains de sorgho, ces chercheurs ont utilisé un milieu de culture synthétique dans lequel les nutriments sont plus facilement assimilables par les micro-organismes. **Une autre explication possible est que certains composants de la couche de péricarpe du grain comme des tanins et des niveaux élevés de pigments à base de phénol et certaines protéines antifongiques peuvent affecter la croissance fongique du fait que ces composés ont été mentionnés comme responsables de la résistance à la détérioration fongique** (Seetharaman et al., 1996 ; Rodriguez -Herrera et al., 1999).

Dans cette étude, *A. tubingensis* a proliféré à 15 °C mais seulement à des  $a_w$  élevées (0,97 et 0,99  $a_w$ ). Des résultats similaires pour *A. carbonarius* ont été signalés par Mitchell et al., (2003), qui ont démontré qu'aucun isolat ne prolifère à 10°C, alors qu'à 15°C, la croissance n'est possible qu'à des niveaux élevés d' $a_w$ . Contrairement à nos résultats, Esteban et al. (2004) ont rapporté qu'*A. niger* a proliféré dans un milieu YES et CYA à une température entre 10 et 45°C. La diversité des résultats d'une étude à une autre peut être due aux différences génétiques entre les souches, les niveaux de température et d' $a_w$  testés et à la composition de substrat.

### **3.2.2- Influence de l'activité de l'eau et de la température sur l'accumulation de l'OTA**

Les concentrations moyennes en OTA produites par les trois isolats d'*Aspergillus tubingensis* à toutes les températures, les  $a_w$  et à toutes les périodes d'échantillonnage sont présentées dans le **tableau 24**.

*Données expérimentales*

**Tableau 24 : Concentration de l'OTA (moyenne + erreur) produite dans les grains de sorgho par trois *Aspergillus tubingensis* à différentes températures et activités d'eau après 7, 14, 21 et 28 jours.**

		Concentration en OTA (µg/g)									
		15 °C		25 °C				37 °C			
Jours		21	28	7	14	21	28	7	14	21	28
<b>Isolats</b>	<b>aw</b>										
<b>AN1</b>	<b>0,88</b>	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG
	<b>0,91</b>	NG	NG			NG	NG			170,96±73,45	6,48±2,29
	<b>0,94</b>	NG	NG			13,59±1,04	16,31±4,96		630,81±501,42	106,22±11,37	
	<b>0,97</b>	8,97±1,16	44,17±1,93		83,61±8,11	46,08±5,28		4,19±0,11	14037,07±13501,41		
	<b>0,99</b>	8,04±1,18	1199,67±1187,71	80,72±10,75	189,02±7,39			17,81±1,93	179,87±44,28		
<b>AN28</b>	<b>0,88</b>	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG
	<b>0,91</b>	NG	NG			NG	NG			140,86±40,49	6,68±1,38
	<b>0,94</b>	NG	NG			10,19±3,05	1652,16±1460,59		174,04±15,76	79,41±41,81	
	<b>0,97</b>	10,92±1,41	487,44±450,62		132,04±85,89	54,22±31,89		29,28±2,64	172,38±27,44		
	<b>0,99</b>	10,31±1,32	264,76±49,42	87,81±44,49	135,12±56,03			19,36±3,95	114,25±55,18		
<b>AN71</b>	<b>0,88</b>	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG
	<b>0,91</b>	NG	NG			14,41±0,54	26,07±3,67			NG	NG
	<b>0,94</b>	NG	NG			54,58±48,21	116,18±107,67		467,36±236,08	89,58±12,81	
	<b>0,97</b>	12,71±1,66	777,65±147,13		246,85±37,86	159,52±28,76		23,58±8,71	251,01±63,65		
	<b>0,99</b>	159,68±103,44	100,08±49,15	23,57±19,38	174,43±42,31			31,48±7,11	161,11±17,57		

< d.l = inférieure à la limite de détection (0,05 µg/g); N.G = pas croissance

## Données expérimentales

Les teneurs maximales en OTA pour les trois isolats ont été détectées à 0,97  $a_w$  et à 25 et 37°C après 14 jours d'incubation, alors que la production minimale détectée est de 4,18  $\mu\text{g/g}$  observée chez l'isolat AN1 à 0,97  $a_w$  et 37°C après 7 jours d'incubation. La quantité d'OTA accumulée pendant les différentes périodes d'incubation varie de 4,19 à 14037,07  $\mu\text{g/g}$ , de 6,86 à 1652,16  $\mu\text{g/g}$  et de 12,71 à 777,65  $\mu\text{g/g}$  respectivement pour les isolats AN1, AN28 et AN71. Contrairement aux études précédentes réalisées sur les milieux synthétiques, nos isolats ont produit de grandes quantités d'OTA. Des travaux antérieurs ont souligné que les données obtenues au sujet de la production de mycotoxines sur les milieux de culture ne peuvent pas être directement extrapolées aux substrats naturels (Belli et al., 2004b ; Garcia, et al., 2011). Ainsi, la présente étude a été réalisée directement sur les grains de sorgho. Astoreca et al. (2009a) ont observé des niveaux élevés d'OTA dans l'étude de l'influence des facteurs abiotiques sur la production d'OTA par *A. niger* dans les graines d'arachide. La production d'OTA a été déterminée après 7 et 14 jours pour les conditions de croissance appropriés : à 25°C x 0,99  $a_w$ , à 37°C x 0,97  $a_w$  et à 37°C x 0,99  $a_w$ . Les résultats montrent que la production d'OTA est significativement plus élevée ( $P < 0,05$ ) après 14 jours d'incubation (de 114,25  $\mu\text{g/g}$  obtenue à 0,99  $a_w$  - 37°C pour l'isolat AN28 à 14037,07  $\mu\text{g/g}$  obtenu à 0,97  $a_w$  - 37°C pour isoler AN1) qu'après 7 jours pour tous les isolats. Selon Esteban et al. (2006), des quantités importantes d'OTA peuvent être atteintes seulement à 5 jours d'incubation à 25°C. Ces auteurs ont indiqué que les conditions optimales pour la production d'OTA par *A. niger* aggregates, lorsqu'il est cultivé sur le milieu YES, ont été observées après 5 à 10 jours d'incubation à 0,96- 0,99  $a_w$ . Le pourcentage de souches productrices d'OTA dans le groupe d'espèces *A. niger* est faible (Abarca et al., 2001). Belli et al. (2004c) ont montré que la valeur optimale d' $a_w$  pour la production d'OTA dans un milieu à base de jus de raisin synthétique par deux souches *A. niger* est de 0,98- 0,995  $a_w$ , après 5 à 10 jours d'incubation.

Pour des conditions favorables à la croissance mais qui ne sont pas optimales (0,94  $a_w$  x 37°C et 0,97  $a_w$  x 25°C), la production d'OTA a été déterminée après 14 et 21 jours. On peut remarquer qu'à 0,94  $a_w$  et 37°C, les concentrations en OTA sont significativement plus élevées ( $P < 0,05$ ) après 14 jours qu'après 21 jours pour tous les isolats. Ainsi, *A. tubingensis* est capable de produire des niveaux élevés d'OTA à 0,94  $a_w$  lorsque la période d'incubation atteint 14 jours. De même, à 0,97  $a_w$  et 25 °C, les niveaux d'OTA ont diminué (non significatif  $P > 0,05$ ) entre le 14<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour. Lorsque la croissance est très lente (0,99  $a_w$  x 15°C, 0,97  $a_w$  x 15°C pour tous les isolats, 0,94  $a_w$  x 25°C et 0,91  $a_w$  x 37°C pour les isolats AN1 et AN28 et à 0,91  $a_w$  x 25°C pour l'isolat AN71), l'OTA a été déterminée après 21 et 28 jours.

## *Données expérimentales*

La teneur en mycotoxines demeure élevée après 28 jours d'incubation à 0,97-0,99  $a_w$  et 15°C (non significatif  $P>0,05$ ). Par contre, à 0,99  $a_w$  et 15°C la teneur en OTA a diminué significativement ( $P<0,05$ ) entre le 21<sup>ème</sup> et le 28<sup>ème</sup> jour d'incubation pour l'isolat AN71. On peut remarquer à partir du **tableau 24** que l'activité d'eau 0,97  $a_w$  est la valeur la plus favorable pour la production d'OTA pour *A. tubingensis* à toutes les températures testées. Mais l'analyse de la variance a montré que la production d'OTA est significativement plus élevée ( $P<0,05$ ) à 0,97  $a_w$  par rapport aux autres valeurs de disponibilité de l'eau uniquement qu'à 25°C. Il n'y a pas de différences significatives entre les différentes valeurs d' $a_w$  à 37 et 15°C. Dans une étude précédente, Astoreca et al. (2009a) a signalé que la production maximale OTA est survenu à 0,973  $a_w$  et 25°C pour deux souches de *A. niger* aggregates cultivées sur des graines d'arachide irradiées; tandis que la production minimale d'OTA a été obtenue à 0,951  $a_w$  et 15°C. Dans cette étude, *A. tubingensis* est en mesure de produire une quantité importante d'OTA à 0,91  $a_w$  lorsqu'il est incubé pendant une période de 21 jours. Ainsi, la concentration moyenne en OTA détectée pour l'isolat AN1 est de 170,96  $\mu\text{g/g}$  et de 140,86  $\mu\text{g/g}$  pour AN71 à 37°C et après 21 jours.

Concernant les températures, les trois isolats d'*A. tubingensis* semblent avoir le même comportement à tous les temps d'analyses pour tous les niveaux d' $a_w$  indépendamment de la température (non significatif  $P>0,05$ ). Dans une étude précédente réalisée sur les grains de maïs, *A. niger* a produit la plus grande quantité d'OTA à 15°C et 0,98  $a_w$  (Alborch et al., 2011). En milieu synthétique de jus de raisin, Leong et al. (2006) ont également signalé que 15°C est la température optimale pour la production d'OTA par *A. niger*. Cependant, la production optimale d'OTA dans les grains de maïs par deux souches d'*A. niger* aggregates a été détecté à 25°C et 0,973  $a_w$  (Astoreca et al., 2009b). Avec l'augmentation de la température d'incubation, le niveau maximal d'OTA a été obtenu plus tôt, après 14 jours. Le temps nécessaire pour atteindre un rendement maximal de production d'OTA augmente avec la diminution de la disponibilité en eau et de la température en raison de l'abaissement du taux de croissance.

**Les conditions optimales pour la croissance du mycélium sont de 0,99  $a_w$  et 37°C ( $P<0,05$ ). Cependant, les trois isolats produisent des niveaux d'OTA nettement inférieurs ( $P<0,05$ ) à 0,99  $a_w$  x 37°C qu'à 0,97  $a_w$  x 25°C, 0,99  $a_w$  x 15°C et 0,97  $a_w$  x 15°C.** Esteban et al. (2004) ont montré qu'*A. niger* aggregate produit de l'OTA à des intervalles de température plus restrictive que ceux de la croissance (de 10 ou 15°C à 25, 30

## Données expérimentales

ou 35°C selon la souche), avec une température optimale qui varie entre 20 et 25°C en fonction de la souche.

L'analyse de la variance de l'influence de différents facteurs individuels et de leur interaction sur la production d'OTA après 7, 14, 21 et 28 jours d'incubation est résumée dans les tableaux 25, 26 et 27. L'interaction entre l' $a_w$  et la température ne semble avoir une influence significative sur la production d'OTA qu'à 21 et 28 jours.

**Tableau 25 : Analyse de variance de l'effet de l'activité de l'eau et de la température sur la production de l'OTA par 3 isolats d'*Aspergillus tubingensis* après 7 et 14 jours d'incubation dans les grains de sorgho**

Facteurs	Degré de liberté	Carré moyen	Valeur de F	Probabilité
T°	1	7186,22	0,61	n.s
$a_w$	1	51553,5	4,4	*
Isolat	2	22492,5	1,92	n.s
TI	1	404008	34,46	**
T° x $a_w$	2	26328	1,33	n.s
T° x isolat	5	11076,5	0,53	n.s
$a_w$ x isolat	5	24479,2	1,25	n.s
T° x $a_w$ x isolat	8	16539,9	0,8	n.s

**Tableau 26 : Analyse de variance de l'effet de l'activité de l'eau et de la température sur la production de l'OTA par 3 isolats d'*Aspergillus tubingensis* après 14 et 21 jours d'incubation dans les grains de sorgho**

Facteurs	Degré de liberté	Carré moyen	Valeur de F	Probabilité
T°	1	41299,4	1	n.s
$a_w$	2	33598,3	0,82	n.s
Isolat	1	4512,24	0,11	n.s
T° x $a_w$	1	41299,4	1,04	n.s
T° x isolat	5	32829,2	0,8	n.s
$a_w$ x isolat	5	32829,2	0,8	n.s
T° x $a_w$ x isolat	5	32829,2	0,8	n.s

## Données expérimentales

**Tableau 27 : Analyse de variance de l'effet de l'activité de l'eau et de la température sur la production de l'OTA par 3 isolats d'*Aspergillus tubingensis* après 21 et 28 jours d'incubation dans les grains de sorgho**

Facteurs	Degré de liberté	Carré moyen	Valeur de F	Probabilité
T°	2	185678	9,74	*
Isolat	2	30487,5	1,6	n.s
TI	1	154023	8,08	*
T° x a <sub>w</sub>	4	90002	4,21	*
T° x isolat	8	57433	2,71	*
a <sub>w</sub> x isolat	11	62276,5	3,27	*
T° x a <sub>w</sub> x isolat	14	49466,4	2,5	*

ns = non significatif.

\* Significatif P < 0,05.

\*\*Significatif P < 0,0001

Dans certains cas, la teneur en OTA diminue avec l'augmentation du temps d'incubation. Les auteurs suggèrent que cela pourrait être dû au fait que les souches sont capables d'assimiler le fragment de phénylalanine à partir de la molécule OTA en tant qu'une autre source d'azote lorsque les milieux de culture sont épuisés (Téren et al., 1996 ; Varga et al., 2006).

Dans notre étude, la prédiction de la physiologie des souches d'*Aspergillus tubingensis* en fonction des facteurs écologiques a montré que les conditions optimales à la croissance et la production d'OTA sont en accord avec les résultats obtenus par certains auteurs alors qu'elles diffèrent des ceux obtenus par d'autres. Contrairement aux études précédentes réalisées sur les milieux synthétiques, nos isolats ont produit de grandes quantités d'OTA dans les grains de sorgho. Nos résultats montrent que les conditions optimales pour la production de l'OTA (0,97 a<sub>w</sub> x 25°C) sont légèrement inférieures à celles de la croissance (0,99 a<sub>w</sub> et 37°C). On remarque aussi que nos isolats prolifèrent et produisent l'OTA à 15°C lorsque les valeurs de l'a<sub>w</sub> sont élevées (0,97 et 0,99 a<sub>w</sub>). D'après nos résultats, *A. tubingensis* prolifère et produit de l'OTA dans un large éventail de température (de 15 à 37°C) et d'humidité (0,91 à 0,99 a<sub>w</sub>). On peut aussi constater que la valeur d'humidité 0,88 a<sub>w</sub> ne permet pas le développement des isolats d'*A. tubingensis* dans les grains de sorgho. Cela suggère que le stockage des grains de céréales à cette a<sub>w</sub> permet peut être d'éviter leurs contamination par l'OTA sachant qu'au cours de notre étude, l'incubation a duré 28 jours seulement alors qu'en réalité le stockage des grains peut durer plusieurs mois. Contrairement à ce qu'on pensait quant à la responsabilité d'*Aspergillus ochraceus* dans la contamination des aliments par

## Données expérimentales

l'OTA, cette étude a montré qu'*Aspergillus tubingensis* (section *Nigri*) est capable de proliférer et de produire des quantités importantes d'OTA dans les grains de sorgho. Cela suggère que la prévention de la contamination du sorgho par l'OTA commence par la lutte contre *Aspergillus* section *nigri* omniprésent et fréquemment détecté dans les céréales.

### 3.3- Profil écophysiological de l'espèce *Fusarium incarnatum*

#### 3.3.1- Influence de l'activité de l'eau et de la température sur la croissance mycélienne

L'analyse de l'influence de la disponibilité de l'eau, de l'isolat et de la température ainsi que leurs interactions sur le taux de croissance par le test ANOVA a révélé que les facteurs simples ( $a_w$  et température) et les combinaisons (isolat x  $a_w$  et température x  $a_w$ ) ont un effet significatif sur la vitesse de croissance (**tableau 28**).

**Tableau 28 : Analyse de variance de l'effet des facteurs simples : température,  $a_w$ , isolat et leurs interactions sur le taux de croissance de trois isolats de *Fusarium incarnatum* dans les grains de sorgho**

Facteurs	Degré de liberté	Carré moyen	Valeur de F	Probabilité
Isolat	2	0,01	1,76	n.s
$a_w$	3	0,13	23,13	**
Température	2	0,04	7,77	*
Isolat x $a_w$	11	0,04	4,46	*
Isolat x température	8	0,01	0,72	n.s
Température x $a_w$	11	0,05	10,86	**

n.s : non significatif

\* : significatif ( $P < 0,05$ )

\*\* : significatif ( $P < 0,0001$ )

L'étude de l'influence de la disponibilité de l'eau, de la température et du temps d'incubation sur la croissance mycélienne des trois isolats de *Fusarium incarnatum* a été réalisée en trois répétitions pour chaque combinaison qui ont montré suffisamment de variabilité, en particulier lorsque les conditions environnementales sont loin de l'optimum. Ainsi, le modèle linéaire utilisé pour déterminer le taux de croissance  $\mu$  et le coefficient  $R^2$  (le pourcentage de variance) a montré que les valeurs de  $R^2$  obtenues varient entre 25,11% et 98,62% (**tableau 29**).

*Données expérimentales*

**Tableau 29 : Valeurs des taux de croissance et des coefficients R<sup>2</sup> des trois isolats de *Fusarium incarnatum* incubés à 15, 25 et 37 °C et à 0,91, 0,94, 0,97 et 0,99 a<sub>w</sub>**

Isolat	T (°C)	0,91 a <sub>w</sub>		0,94 a <sub>w</sub>		0,97 a <sub>w</sub>		0,99 a <sub>w</sub>	
		μ (mm/j)	R <sup>2</sup> (%)						
F79	15	N.G		0,71±0,01	73,51	1,85±0,02	67,37	2,41±0,01	89,66
	25	N.G		1,92±0,02	81,34	2,71±0,04	66,22	6,42±0,03	97,43
	37	N.G		0,66±0,01	43,27	2,05±0,02	75,12	2,93±0,01	94,89
F86	15	N.G		0,24±0,01	64,38	1,32±0,01	75,85	2,04±0,01	98,62
	25	0,48±0,02	25,11	0,89±0,01	71,27	2,75±0,04	65,48	3,05±0,03	73,35
	37	N.G		0,41±0,01	41,97	2,3±0,02	84,6	2,31±0,01	95,88
F115	15	N.G		0,2±0,01	37,1	1,2±0,01	87,7	1,41±0,01	89,95
	25	N.G		0,93±0,01	54,09	3,32±0,02	91,41	3,34±0,04	76,58
	37	N.G		1,25±0,02	75,59	0,82±0,02	41,58	2,8±0,01	93,8

N.G : no growth (pas de croissance)

μ : taux de croissance (mm/j)

## *Données expérimentales*

Le comportement des trois isolats varie selon la température et l' $a_w$ . Lorsque les valeurs d'humidité et de température sont élevées, la colonie augmente de diamètre rapidement jusqu'à atteindre les bords de la boîte de pétri après quelques jours d'incubation. Alors que, si les conditions ne sont pas favorables, la colonie croît lentement sans atteindre 9 cm de diamètre pendant les 4 semaines d'incubation. Généralement, le taux de croissance a augmenté de façon significative de 0,94 à 0,99  $a_w$  à toutes les températures (**figure 20**), bien que la différence entre les deux niveaux d'humidité 0,97 et 0,99  $a_w$  ne soit pas significative. Les trois isolats de *Fusarium incarnatum* ont proliféré plus rapidement à 25°C qu'à 15 et 37°C, mais la différence entre 37 et 25°C n'a pas été significative ( $P>0,05$ ). Toutefois, les taux de croissance sont plus élevés à 25 °C x 0,99  $a_w$  qu'à 37 °C x 0,99  $a_w$  (non significatif).

Ainsi, les taux de croissance les plus élevés observés pour les isolats F79, F86 et F115 sont de 6,42, 3,05 et 3,34 mm/jour, respectivement à 0,99  $a_w$  et 25°C (**tableau 29**). Ces valeurs sont comparables aux taux de croissance radiale rapportés par Samapundo et al. (2005), de 4,034 et 7,571 mm/jour observés à 30°C et à 0,982  $a_w$  et 0,976  $a_w$ , pour *F. proliferatum* et *F. verticillioides*, respectivement, et par Marin et al. (1999a), de 5,5 et 6,5 mm/jour à 30 °C et 0,98  $a_w$  pour *F. proliferatum* et *F. moniliforme*, respectivement. Des résultats similaires ont été obtenus par Marin et al. (2010) qui ont étudié l'effet de la température dans un intervalle de 15 à 35°C sur la vitesse de croissance de *Fusarium graminearum* dans le blé espagnol. Ils ont indiqué que le taux de croissance le plus rapide est observée à 25°C, bien que les taux de croissance restent toujours élevés à 20°C et 30°C. Cependant, les mêmes chercheurs ont remarqué que, à des températures marginales c'est-à-dire à 15°C et entre 30 et 35°C, la croissance a fortement diminué pour les souches étudiées de *F. graminearum*. De façon générale, les conditions optimales pour la croissance du *Fusarium* varient selon les espèces, les milieux de culture utilisés et les intervalles de températures et d' $a_w$  testés. Hector et al. (1988) ont suggéré que la température optimale pour la croissance de *F. moniliforme* est probablement de 25°C, tandis que *F. semitectum* atteint un maximum de croissance à 20°C.

## Données expérimentales

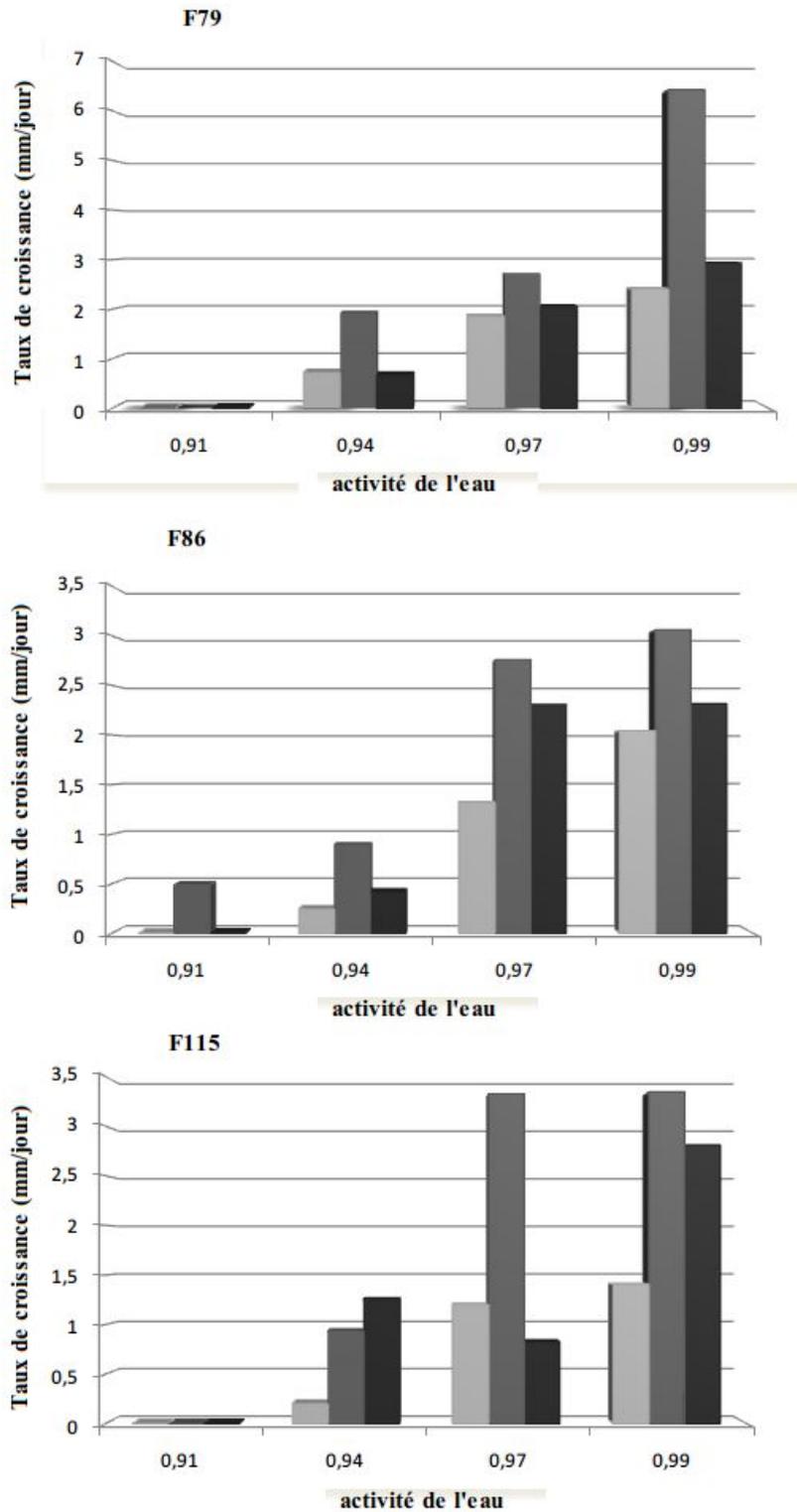


Figure 20 : Effet de la température et de l'activité de l'eau sur le taux de croissance (mm/jour) des trois isolats de *Fusarium incarnatum* cultivés sur les grains de sorgho à 37 (■), 25 (▣) et 15 °C (□)

## *Données expérimentales*

Les taux de croissance minimum observés sont de 0,2 et 0,24 mm/jour pour les isolats F115 et F86 respectivement, à 15°C et 0,94  $a_w$ . A 15°C, les trois isolats présentent un comportement similaire à des valeurs différentes de disponibilité de l'eau. Aucune croissance fongique n'a été observée à 0,91  $a_w$  à toutes les températures, sauf pour l'isolat F86 qui a proliféré à 25°C. Des résultats similaires ont été obtenus par Torres et al. (2003) qui ont montré qu'à 0,92  $a_w$ , la germination est observée uniquement à 30°C. Contrairement à nos résultats, Samapundo et al. (2005) ont suggéré que la croissance est possible à un niveau d'humidité plus faible d'environ 0,869 et 0,854  $a_w$ , alors qu'aucune croissance n'a eu lieu à 0,831 et 0,838  $a_w$  pour *F. verticillioides* et *F. proliferatum*, respectivement. En outre, Marin et al. (1996) ont montré que l' $a_w$  minimale pour la croissance des deux espèces de *F. moniliforme* et *F. proliferatum* est 0,880 avec une croissance nulle à 0,850  $a_w$ . Cependant, Cahagnier et al. (1995) ont suggéré que 0,85  $a_w$  est le seuil de croissance de *F. verticillioides*. Par conséquent, d'autres études sont nécessaires pour tester la croissance fongique à des valeurs d' $a_w$  plus basses pour trouver le niveau de disponibilité d'eau qui ne permet pas la croissance chez les souches tunisiennes de *Fusarium incarnatum*.

### **3.3.2- Influence de l'activité de l'eau et de la température sur l'accumulation de la ZEN**

La ZEN est analysée après 7 et 14 jours d'incubation pour les conditions optimales à la croissance (25°C x 0,99  $a_w$ , 25°C x 0,97  $a_w$ , 37°C x 0,99  $a_w$  et 37°C x 0,97  $a_w$ ). Pour des conditions favorables à la croissance mais qui ne sont pas optimales (15°C x 0,99  $a_w$ , 15°C x 0,97  $a_w$ , 37°C x 0,94  $a_w$ , 25°C x 0,94  $a_w$  et 25°C x 0,91  $a_w$ ), la ZEN est déterminée après 14 et 21 jours de croissance. A 15°C et à 0,94  $a_w$ , où la croissance est très lente, la production de la ZEN est analysée après 21 et 28 jours d'incubation. L'analyse de variance avec le test ANOVA a montré que tous les facteurs individuels ainsi que leurs interactions n'ont aucune influence significative ( $P > 0,05$ ) sur la production de la ZEN à tous les temps de prélèvements, sauf à 21 et 28 jours où les facteurs isolat, activité de l'eau x isolat, activité de l'eau x températures x isolat affectent significativement la production de la ZEN ( $P < 0,05$ ) (**tableau 30**).

## Données expérimentales

**Tableau 30 : Analyse de variance de l'effet des facteurs simples : température,  $a_w$ , isolat, temps d'incubation ainsi que leurs interactions sur la production de ZEN par trois isolats de *Fusarium incarnatum* cultivés sur des grains de sorgho après 21 et 28 jours d'incubation.**

Facteurs	Degré de liberté	Carré moyen	Valeur de F	Probabilité
Température	1	671,788	3,28	n.s
$a_w$	1	713,675	3,48	n.s
Isolat	2	916,502	4,47	*
temps d'incubation	1	327,46	1,6	n.s
Température x isolat	5	417,128	1,84	n.s
$a_w$ x isolat	5	677,769	3,4	*
Température x $a_w$ x isolat	8	558,742	2,97	*

n.s : non significatif

\* : significatif ( $P < 0,05$ )

Au cours de cette étude, les résultats ont montré que, à chaque température, la valeur de la disponibilité de l'eau permettant de produire une teneur maximale en ZEN et le temps d'incubation nécessaire pour atteindre cette production maximale varient d'un isolat à l'autre (**tableau 31**). A 37°C, le niveau maximal de la ZEN a été observé à 0,94  $a_w$  et après 21 jours d'incubation pour les deux isolats F86 et F115. Cependant, la production optimale de l'isolat F79 a été obtenue à 0,97  $a_w$  et après 14 jours d'incubation. A 25°C, l'isolat F79 produit une concentration maximale de ZEN de 29,58 ng/g à 0,97  $a_w$  et après 14 jours d'incubation. La production maximale pour l'isolat F86 a été obtenue à 0,91  $a_w$  et après 14 jours d'incubation. Cependant, un niveau maximum de 34,72 ng/g de ZEN a été produit par l'isolat F115 après 14 jours d'incubation et à 0,94  $a_w$ . A 15°C, des concentrations très élevées de ZEN dépassant les 90 ng/g ont été obtenues pour les deux isolats F79 et F86 à 0,99  $a_w$  après 21 jours d'incubation. Cependant, l'isolat F115 a atteint une production maximale à 0,97  $a_w$  et après 14 jours d'incubation. Par conséquent, la production de niveaux élevés de ZEN par *Fusarium incarnatum* est possible même à de faibles valeurs d'activité d'eau et à une basse température. **Contrairement à l'ancienne conception concernant l'inhibition de la biosynthèse des mycotoxines par les basses températures, nos résultats suggèrent que les souches tunisiennes de *F. incarnatum* ne nécessitent pas des températures élevées pour produire des quantités importantes de ZEN.**

*Données expérimentales*

**Tableau 31 : Concentration de la ZEN (moyenne + erreur) produite dans les grains de sorgho par trois isolats de *Fusarium incarnatum* à différentes températures et activités d'eau après 7, 14, 21 et 28 jours**

Isolat	Concentration moyenne en ZEN (ng/g)												
	15 °C				25 °C				37 °C				
	a <sub>w</sub>	7 j	14 j	21 j	28 j	7 j	14 j	21 j	28 j	7 j	14 j	21 j	28 j
<b>F79</b>	<b>0,91</b>	N.G	N.G	N.G	N.G	N.G	N.G	N.G	N.G	N.G	N.G	N.G	N.G
	<b>0,94</b>			6,28±3,44	7,32±3,99	<ld	23,37±17,88			8,27±2,64	19,93±8,98		
	<b>0,97</b>		8,64±3,59	18,41±11,91		14,39±1,22	29,58±24,39			36,54±23,71	61,7±54,72		
	<b>0,99</b>		9,06±4,22	97,96±72,01		21,75±11,23	23,04±20,36			11,46±2,53	7,12±0,9		
<b>F86</b>	<b>0,91</b>	N.G	N.G	N.G	N.G		91,36±47,76	6,14±1,87		N.G	N.G	N.G	N.G
	<b>0,94</b>			3,54±0,64	23,17±18,91		14,19±11,67	7,16±2,94			5,22±0,78	46,51±24,15	
	<b>0,97</b>		63,67±43,22	5,01±0,41		17,6±4,41	17,06±7,64			22,94±8,84	20,37±8,1		
	<b>0,99</b>		<ld	99,97±83,65		14,97±5,71	6,08±1,57			5,57±2,26	15,99±4,5		
<b>F115</b>	<b>0,91</b>	N.G	N.G	N.G	N.G	N.G	N.G	N.G	N.G	N.G	N.G	N.G	N.G
	<b>0,94</b>			6,39±3,71	9,29±5,54		34,72±6,12	8,01±2,41			24,14±14,19	75,13±63,52	
	<b>0,97</b>		39,53±8,12	7,94±3,39		8,27±2,68	27,96±4,15			32,83±24,86	9,35±2,23		
	<b>0,99</b>		7,59±1,64	7,49±2,03		5,2±1,22	33,64±31,25			7,21±2,38	6,68±0,91		

Limite de détection (2,7 ng/g); N.G = pas de croissance (no growth)

## *Données expérimentales*

Sherwood et Peberdy (1974) ont montré qu'une température de stress (de 12 à 18°C) pendant toute la période d'incubation est nécessaire pour que l'espèce *Fusarium graminearum* puisse produire des niveaux élevés de ZEN dans une large gamme d'humidité. Il semble que l'espèce *Fusarium incarnatum* produit aussi plus de ZEN à une température de stress comme la température 15°C utilisée dans notre étude même si la croissance à cette température est faible. Il semble raisonnable de penser que les différences constatées liées aux conditions optimales de production dépendent très étroitement de la souche. Les résultats des différentes études réalisées montrent une variabilité très importante concernant la température et l'activité de l'eau optimales pour la production de la ZEN par les espèces potentiellement productrices. Certains auteurs soulignent qu'il est impossible d'obtenir des conclusions générales qui peuvent être applicables à différentes souches fongiques afin de contrôler la production de ZEN. Cependant, selon Milano et López (1991), l'exposition à des températures basses inhibe complètement la synthèse de la ZEN par *Fusarium graminearum* et *Fusarium oxysporum*. Selon Ryu et Bullerman (1999), l'effet des cycles de température sur la production de ZEN par rapport aux températures constantes dans certains cas, stimule plus la mycotoxinogénèse. **En général, nos résultats ont montré qu'il n'y a pas de corrélation entre la croissance et la production de ZEN dans le cas de *F. incarnatum*.** Cependant, il n'y a pas de données concernant l'influence des facteurs abiotiques sur la production ZEN par cette espèce. Bien que plusieurs chercheurs ont suggéré que la croissance fongique et la production de ZEN augmentaient avec la teneur en humidité du substrat (Jiménez et al., 1996 ; Bresler et al., 1998), **nos résultats ont montré que *F. incarnatum* peut produire des niveaux élevés de ZEN à des valeurs d'humidité faibles.** En fait, très peu d'études permettant de déterminer avec précision la valeur optimale d'humidité pour une production maximale de ZEN ont été réalisées. Ainsi, d'autres études sont nécessaires pour tester la croissance fongique et la production de ZEN dans une gamme plus large d'activité de l'eau et de température. A partir du **tableau 30**, on remarque que la période d'incubation de 14 à 21 jours est suffisante pour produire des niveaux élevés de ZEN. Les chercheurs ont montré que le niveau de production maximale de la ZEN a été atteint après seulement trois semaines, et il est resté à peu près constant entre la troisième et la quatrième semaines et a diminué par la suite (Ryu & Bullerman, 1999 ; Llorens et al., 2004).

A partir du **tableau 31**, on peut noter que, parfois, la teneur en mycotoxines après un certain temps d'incubation commence à diminuer. **La diminution de la concentration de ZEN après avoir atteint l'accumulation maximale est due à la libération d'enzymes lors**

## *Données expérimentales*

**de la lyse cellulaire** (Bacon et al., 1977 ; Damoglou et al., 1984) **ou à l'épuisement des sources de nutriments puisque le germe est partie du grain où commence l'invasion des céréales par les moisissures** (Bechtel et al., 1985). Il faut noter que, si ZEN a été métabolisé en une autre forme de molécules qui sont généralement plus oestrogéniques que la molécule initiale (par exemple :  $\alpha$ -zéaralénol,  $\beta$ -zéaralénol, glycosides de zéaralénone et sulfate de zéaralénone) (Vendl et al., 2009), celles-ci ne peuvent pas être détectées par HPLC. **Par conséquent, les métabolites de ZEN doivent être pris en considération pour les produits alimentaires fortement contaminés.**

Ce travail constitue la première étude réalisée sur l'effet des facteurs abiotiques (l'activité de l'eau et la température) sur le taux de croissance et la production de ZEN par l'espèce *Fusarium incarnatum*. D'autres études ont été menées sur d'autres espèces de *Fusarium* telles que *F. graminearum* et *F. verticillioides*. Dans le cas de *Fusarium incarnatum*, on peut conclure **qu'il n'y a pas de corrélation entre la croissance et la production de ZEN**. En effet, les taux de croissance maximum ont été observés à 25°C et à 0,99  $a_w$  pour tous les isolats, alors que l'optimum de l'accumulation de la ZEN diffère d'un isolat à un autre. Ainsi, il est impossible de définir les conditions optimales pour la production de ZEN. Des études sur un intervalle plus large d' $a_w$  sont donc nécessaires. Il est important de noter que d'autres paramètres qui entrent en jeu doivent être considérés pour obtenir des prédictions plus significatives. Ces paramètres comprennent la composition gazeuse de l'atmosphère de stockage, l'effet des cycles de températures, la présence de compétition sur le substrat, les pratiques de culture, et l'effet des agents anti-fongiques. Les modèles évalués peuvent être appliqués ensuite au développement des conditions appropriées/optimales pour la conservation des grains de sorgho, qui assurent l'inhibition de la croissance de *Fusarium incarnatum*.

Les résultats obtenus au cours de cette étude permettent d'établir un plan HACCP afin d'éviter la contamination des céréales comme le sorgho par les mycotoxines. Dans le cas du sorgho, les aflatoxines demeurent les mycotoxines les plus susceptibles à survenir suivies par l'OTA et les toxines de *Fusarium*. Ainsi, un plan HACCP visant la lutte contre ces mycotoxines doit être conçu dans la filière des céréales.

Si on considère par exemple une industrie de fabrication de produits à base de sorgho dont les niveaux finaux de l'AFB1 et des aflatoxines totales doivent être respectivement

## *Données expérimentales*

inférieurs à 2 et 4 ng/g. La surveillance de ces mycotoxines doit débuter depuis le champs parce que la contamination de cette céréale par les *Aspergillus* commence au stade pré-récolte. Le choix du fongicide approprié et du moment de son usage sont des étapes clés pour réduire la biomasse des Aspergilli. De même, on peut éviter la période des hautes températures au moment de la formation des graines par le choix de la date de semis. Il faut aussi lutter contre les insectes. Si les grains de sorgho subissent un lavage à l'eau au stade post-récolte, un séchage immédiat de 48 h au soleil doit être appliqué. Ainsi, l'industrie ne doit recevoir une matière première que si la teneur en eau est inférieure à 14% à 20°C (la teneur en eau à partir de laquelle les moisissures peuvent proliférer dans les céréales). La lutte contre les ravageurs, les insectes, l'élévation de la température (systèmes de ventilation au cours du stockage) et de l'humidité est primordiale dans les lieux d'entreposage. Le niveau d'aflatoxines dans la matière première doit être inférieur aux limites fixées. Le débarras des grains moisiss ou fissurés par les insectes peut réduire la possibilité de contamination du produit fini. Au cours de la fabrication, les machines et l'air doivent être exempts de spores de moisissures. Enfin, l'emballage du produit fini (poudre de sorgho par exemple) doit être réalisé sous vide pour éviter la présence d'O<sub>2</sub>. Pour l'emballage, on utilise une matière plastique imperméable à l'eau et l'air. Le produit fini doit être dépourvu de spores de moisissures avec des niveaux d'humidité et des aflatoxines inférieurs aux limites fixées.

### **4- Conclusion**

Cette étude est une approche qui vise à comprendre la physiologie des espèces fongiques productrices de mycotoxines vis-à-vis du climat dans le but de fixer des niveaux limites à ne pas dépasser permettant de contrôler leur prolifération dans les céréales. Par contre, **les niveaux optimaux obtenus au cours de cette étude peuvent varier d'une année à une autre en fonction de la variation des conditions climatiques, des mutations qui peuvent avoir lieu ou l'émergence d'autres souches en la Tunisie à cause de l'importation des graines de céréales d'autres pays.**

**Pour avoir des données plus réalistes, on propose d'étudier l'influence des fluctuations de température et de l'humidité sur l'accumulation des mycotoxines dans les céréales. Il est important aussi d'étudier l'effet de la compétition entre les champignons toxinogènes sur la croissance et la production des mycotoxines et l'usage des agents antifongiques.**

## Conclusions générales et perspectives

---

## Conclusions générales et perspectives

### Conclusions générales et perspectives

Au cours de notre travail, on s'est proposé de déterminer la mycobiota (flore fongique) du sorgho, de caractériser les espèces responsables de l'accumulation de ces mycotoxines dans cette céréale, d'évaluer la capacité de produire les mycotoxines par les espèces connues toxigènes, de déterminer l'incidence de l'AFB1, l'OTA et la ZEN dans les échantillons de sorgho et surtout d'étudier les profil écophysologiques de trois espèces toxigènes qui sont : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tubingensis* et *Fusarium incarnatum* en appliquant des modèles mathématiques primaires couramment utilisés en microbiologie prédictive.

Au cours de cette étude, les résultats de l'énumération ont montré que les espèces de mycètes les plus fréquemment rencontrées sont des espèces appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Alternaria* et *Penicillium*. Les espèces appartenant à *Aspergillus* section *flavi* et *nigri* sont les prédominantes. L'identification de la mycobiota interne a montré la prédominance des genres *Fusarium*, *Aspergillus* et *Alternaria*. L'incidence élevée des moisissures de stockage comme *Aspergillus*, *Penicillium* et *Eurotium* est due au fait que les échantillons ne sont pas fraîchement récoltés. Parmi les isolats appartenant au genre *Aspergillus*, *Aspergillus* section *flavi* et section *nigri* sont les plus rencontrés dans cette étude. ***A. flavus* est l'espèce la plus courante parmi la section *flavi* dans les grains de sorgho, alors qu'*Aspergillus niger* aggregate sont les plus dominants de la section *nigri*. Parmi les espèces appartenant au genre *Fusarium*, *Fusarium incarnatum* est le plus dominant. La présence des espèces de *Fusarium* section *liseola* dans le sorgho nous conduit à contrôler la contamination de cette céréale par les fumonisines. Il est aussi important d'étudier la contamination du sorgho par la citrinine puisque l'identification de la flore fongique a révélé la présence de *Penicillium citrinum* dans les échantillons analysés.** L'évaluation de la capacité de production des mycotoxines des champignons a montré que 40,24% d'*Aspergillus flavus*, 4,61% d'*Aspergillus* section *Nigri* et 11,09% des isolats appartenant au genre *Fusarium* sont producteurs d'AFB1, OTA et ZEN, respectivement. La faible présence des producteurs d'OTA est due à l'absence de détection d'*A. carbonarius*. Un isolat d'*Aspergillus flocculosus* (*Aspergillus* section *circumdati*) a montré la plus grande capacité de production d'OTA (492,33 µg/kg) et **c'est la première fois qu'on l'isole du sorgho**. L'absence des *F. graminearum* et *F. culmorum* explique la faible incidence des producteurs de ZEN.

Les résultats ont montré la contamination du sorgho commercialisé en Tunisie par l'AFB1, l'OTA et la ZEN. Nos résultats montrent que le sorgho commercialisé en Tunisie est

## *Conclusions générales et perspectives*

contaminé par l'AFB1. Les échantillons positifs représentent 59,37% avec des teneurs allant de 0,03 à 31,7 ng/g et une valeur moyenne de  $1,71 \pm 0,57$  ng/g. Parmi les échantillons positifs, seulement 14,06% contiennent une teneur en AFB1 supérieure à celle fixée par la CE (2 ng/g). Nos résultats ont montré aussi que l'OTA a été détectée dans 37,5% des échantillons avec des concentrations allant de 1,04 à 27,8 ng/g et une concentration moyenne de  $1,85 \pm 0,55$  ng/g. Seuls 17,18% échantillons contiennent un niveau d'OTA au-dessus de la limite de sécurité (3 ng/g). Nos résultats ont montré que la ZEN a été détecté dans 32,81%. La concentration de la ZEN varie entre 3,75 et 64,52 ng/g et la valeur moyenne est de  $7,74 \pm 1,37$  ng/g. Aucun échantillon n'est contaminé par un niveau de ZEN supérieure à la limite de sécurité (100 ng/g). Certains échantillons sont contaminés par les trois mycotoxines. Au cours de ce travail, nous avons montré que l'AFB1, l'OTA et la ZEN contaminent le sorgho, et peuvent aussi co-exister à cause de la diversité de la flore fongique de cette céréale. Ainsi, 12,5% des échantillons analysés sont contaminés par les trois mycotoxines.

Il n'y a pas de corrélation entre l'incidence des mycotoxines et celle des espèces connues productrices ainsi que le pourcentage des isolats prouvés producteurs. Ceci peut être expliqué par : le faible nombre de grains isolés sur DRBC et VM (200 graines) qui peuvent ne pas contenir toutes les espèces productrices, la compétition entre les isolats émergeant d'un grain quelconque sur le milieu de culture (généralement, à partir d'un grain, un maximum de trois colonies peuvent proliférer), la désinfection partielle des grains peut éliminer quelques souches productrices et enfin, les champignons peuvent disparaître alors que la mycotoxine persiste à cause de sa stabilité.

Les études de l'influence des facteurs abiotiques sur la croissance et la production des mycotoxines ont été réalisées directement sur les grains de sorgho. Dans cette étude, les résultats ont révélé qu'*Aspergillus flavus* prolifère et produit plus d'AFB1 à 37°C qu'à 25°C. En effet, les souches tunisiennes ont peut être développé une tolérance au climat chaud et humide, ce qui explique la croissance et l'aflatoxinogénèse favorisées à des niveaux élevés de température et d' $a_w$ . D'après nos résultats, il est possible d'éviter l'accumulation de l'AFB1 en stockant le sorgho à des activités d'eau inférieures à 0,91  $a_w$  tout en gardant la température basse. **Les souches tunisiennes d'*Aspergillus flavus* sont capables de croître dans un large intervalle de température et de disponibilité de l'eau (de 0,91 à 0,99  $a_w$  et de 15 à 37°C), mais produisent l'AFB1 dans une gamme plus étroite (de 0,94  $a_w$  à 0,99 et de 25 à 37°C).**

Contrairement aux études précédentes réalisées sur les milieux synthétiques, nos isolats ont produit de grandes quantités d'OTA dans les grains de sorgho. **Les conditions**

## *Conclusions générales et perspectives*

**optimales pour la croissance du mycélium sont de 0,99 a<sub>w</sub> et 37°C.** Cependant, les trois isolats produisent des niveaux d'OTA nettement inférieurs à 0,99 a<sub>w</sub> x 37°C qu'à 0,97 a<sub>w</sub> x 25°C, 0,99 a<sub>w</sub> x 15°C et 0,97 a<sub>w</sub> x 15°C. **La production de l'OTA est significativement supérieure à 0,97 a<sub>w</sub> et 25°C.** Nos résultats montrent qu'*Aspergillus tubingensis* prolifère et produit de l'OTA à 15°C lorsque la disponibilité de l'eau est élevée (0,97 et 0,99 a<sub>w</sub>) et la période d'incubation dépasse 21 jours. D'après nos résultats, le stockage des grains de céréales à 0,88 a<sub>w</sub> peut être convenable pour éviter la production d'OTA par les espèces d'*A. niger*. Mais il faut tester cette activité d'eau pour des périodes d'incubation supérieures à 28 jours. Contrairement aux anciennes connaissances relatives à la responsabilité d'*Aspergillus ochraceus* dans la contamination des aliments par l'OTA, cette étude a montré que **les souches tunisiennes d'*Aspergillus tubingensis* (section *Nigri*) sont capables de proliférer et de produire des quantités importantes d'OTA dans les grains de sorgho.** Cela suggère qu'en Tunisie la prévention de la contamination du sorgho par l'OTA commence par la lutte contre *Aspergillus niger* omniprésent et fréquemment détecté dans les céréales.

L'étude de l'influence des facteurs écologiques sur la croissance et la production de la zéaralénone par *Fusarium incarnatum* inoculé dans les grains de sorgho a montré qu'il n'y a pas de corrélation entre la croissance mycélienne et la production de la ZEN. Ainsi, **les conditions optimales à la prolifération du *Fusarium incarnatum* sont 25°C et 0,99 a<sub>w</sub>.** Alors que pour la production de la ZEN, il semble, qu'à chaque température, la valeur de la disponibilité de l'eau permettant de produire une teneur maximale en ZEN et le temps d'incubation nécessaire pour atteindre cette production maximale varient d'un isolat à l'autre. Nos résultats montrent que les souches tunisiennes de *Fusarium incarnatum* sont capables de produire des quantités importantes de ZEN même à des basses températures (15°C) ou à des faibles valeurs d'activité d'eau (0,91 a<sub>w</sub>). D'après nos résultats, il semble **qu'une température de stress est favorable à la production de ZEN par *Fusarium incarnatum*.** Les résultats obtenus au cours de cette étude ne permettent pas d'obtenir une conclusion sur la valeur optimale d'humidité pour la production de la ZEN par l'espèce *Fusarium incarnatum*. D'autres études sont nécessaires pour tester la croissance fongique à des valeurs d'a<sub>w</sub> plus basses pour trouver le niveau de disponibilité d'eau qui ne permet pas la croissance chez les souches tunisiennes de *Fusarium incarnatum*. **Cependant, il n'y a pas de données concernant l'influence des facteurs abiotiques sur la production ZEN par cette espèce.**

Nous avons remarqué au cours des études des profils écophysiologiques des trois espèces : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tubingensis* et *Fusarium incarnatum*, que les

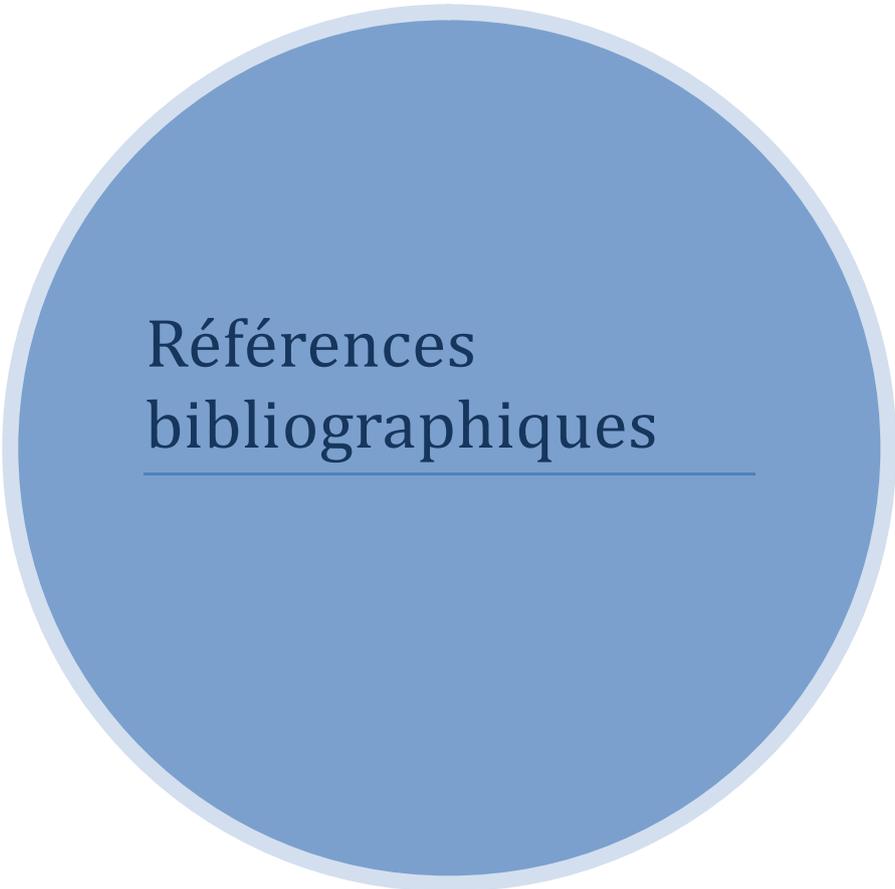
## *Conclusions générales et perspectives*

conditions optimales pour la prolifération fongique et l'accumulation des mycotoxines ne sont pas toujours en accord avec celles obtenues par les autres auteurs. **Il semble que les souches tunisiennes se sont adaptées aux conditions climatiques de notre pays. Ainsi, la diversité des résultats d'une étude à une autre peut être due aux différences génétiques entre les souches mais aussi aux niveaux de température et d' $a_w$  testés au cours de l'étude et à la composition de substrat.** D'après notre étude, on remarque que nos souches commencent à germer et à proliférer à des valeurs d'humidité plus élevées que celles observées par différents auteurs qui ont utilisé des milieux de culture synthétiques. Par conséquent, les substrats naturels comme les grains du sorgho montrent plus de résistance à l'infestation par les moisissures grâce à leurs structure tissulaire, la présence de la paroi qui représente une barrière physique, le système immunitaire de la plante qui s'oppose à l'infestation et la présence de certains composés phénoliques dotés d'une activité antifongique.

Finalement, les résultats obtenus des études des profils écophysiologiques des trois espèces fongiques montrent que, pour toutes les mycotoxines étudiées, la teneur de la mycotoxine commence à diminuer après avoir atteint un niveau maximal. Les auteurs ont expliqué ce phénomène par la dégradation du métabolite par le champignon producteur. Cela suggère qu'il est intéressant de déterminer les niveaux des métabolites issus de la dégradation des mycotoxines dans les échantillons fortement contaminés.

Cette étude est une approche qui vise à comprendre la physiologie des espèces fongiques productrices de mycotoxines vis-à-vis du climat dans le but de fixer des niveaux limites à ne pas dépasser permettant de contrôler leur prolifération dans les céréales. Par contre, **les niveaux optimaux obtenus au cours de cette étude peuvent varier d'une année à une autre en fonction de la variation des conditions climatiques, des mutations qui peuvent avoir lieu ou l'émergence d'autres souches en la Tunisie à cause de l'importation des graines de céréales d'autres pays.**

**Pour avoir des données plus réalistes, on propose d'étudier l'influence des fluctuations de température et de l'humidité sur l'accumulation des mycotoxines dans les céréales. Il est important aussi d'étudier l'effet de la compétition entre les champignons toxigènes sur la croissance et la production des mycotoxines et l'usage des agents antifongiques.**



Références  
bibliographiques

---

A

- Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castella, G., Cabanes, F.J. 1994.** Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var-*niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2650-2652.
- Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., Cabañes, F.J. 2001.** Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *Journal of Food Protection* 64, 903-906.
- Abbes, S., Ben Salah-Abbes, J., Ouanes, Z., Houas, Z., Othman, O., Bacha, H., Abdel-Wahab, M.A., Oueslati, R. 2006.** Preventive role of phyllosilicate clay on the immunological and biochemical toxicity of zearalenone in Balb/c mice. *International Immunopharmacology* 6, 1251-1258.
- Abbes, S., Ouanes, Z., Ben Salah-Abbes, J., Abdel-Wahhab, M., Oueslati, R., Bacha, H. 2007.** Preventive role of aluminosilicate clay against induction of micronuclei and chromosome aberrations in bone-marrow cells of Balb/c mice treated with zearalenone. *Mutation Research* 631, 85-92.
- Abid-Essafi, S., Hassen, W., Achour, A., Skhiri, H., Maaroufi, K., Ellouz, F., Creppy, E., Bacha, H. 2003.** Ochratoxin A and human chronic nephropathy in Tunisia: is the situation endemic? *Human and Experimental Toxicologie* 22, 77-84.
- Adams, R.Z. 2002.** Indoor Environment Connections Featured Public Library Closes Down for Mold Investigation [www.ieconnections.com/archive/jan\\_01/jan-01.htm](http://www.ieconnections.com/archive/jan_01/jan-01.htm).
- Adams, M.R., Moss, M.O. 2002.** Toxingenic fungi. *Food Microbiology*. RSC, UK, 282-301.
- Alborch, L., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Cabañes, F.J. 2011.** Effect of water activity, temperature and incubation time on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* on maize kernels. *International Journal of Food Microbiology* 147, 53-57.
- Alves dos Reis, T., Zorzete, P., Pozzi, C.R., da Silva, V.N., Ortega, E., Correa, B. 2010.** Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian sorghum from sowing to harvest. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90 (9), 1445-1451.
- Anon, Council for Agricultural Science and Technology (CAST). 1989.** *Task Force Report*, 116, 37.
- Anonyme 1: COCERAL, Balance sheet for cereals 2012/13-2011/12.** Available at <http://www.coceral.com/web/march%202013/1011306087/list1187970368/fl.html>  
Accessed 13.05.13.

## Références bibliographiques

- Aoyama K., Ishikuro E., Nishiwaki M., Ichinoe. 2009.** Zearalenone Contamination and the Causative Fungi in Sorghum. *Journal of Food Hygiene Society of Japan* 50 (2), 47-51.
- Arrus, K., Blank, G., Abramson, D., Clear, R., Holley, R.A. 2005.** Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *Journal of stored products research* 41, 513-527.
- Association of Official Analytical Chemists AOAC (2000).** Preparation of standards for mycotoxins. AOAC International Official Methods of analysis. Chapter 49. *Natural Toxins*, p 4-5.
- Astoreca, A., Magnoli, C., Ramirez, M.L., Combina, M., Dalcero, A. 2007.** Water activity and temperature effects on growth of *Aspergillus niger*, *A. awamori* and *A. carbonarius* isolated from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 119, 314-318.
- Astoreca, A., Barberis, C., Magnoli, C., Combina, M., Dalcero, A. 2009a.** Ecophysiological factor effect on growth rate, lag phase and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate strains on irradiated peanut seeds. *International Journal of Food Microbiology* 129, 131-135.
- Astoreca, A., Barberis, C., Magnoli, C., Combina, M., Dalcero, A. 2009b.** Influence of ecophysiological factors on growth, lag phase and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate strains in irradiated corn grains. *International Journal of Food Microbiology* 129, 174-179.
- Astoreca, A., Vaamonde, G., Dalcero, A., Ramos, A.J., Marin, S. 2012.** Modelling of the effect of temperatura and wáter activity of *Aspergillus flavus* isolates from corn. *International Journal of Food Microbiology* 156, 60-67.
- Atoui, A., Dao, H. P., Mathieu, F., Lebrihi, A. 2006.** Amplification and diversity analysis of ketosynthase domains of putative polyketide synthase genes in *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* producers of ochratoxin A. *Molecular Nutrition and Food Research* 50, 488-493.
- Aziz, N.H., Moussa, L.A.A. 2004.** Reduction of fungi and mycotoxins formation in seeds by gamma-irradiation. *Journal of Food Safety* 24, 109-127.
- Ayalew, A., Fechrman, H., Lepschy, J., Beck, R., Abate, D. 2006.** Natural occurrence of mycotoxins in staple cereals from Ethiopia. *Mycopathologia* 162, 57-63.
- Ayres, G.I., Mund, T.I., Sondin, E.W. 1980.** Microbiology of Food Spices and Condiments. A Series of Books in Food and Nutrition. Schmeigert, 249pp.
- Ayerst, G. 1969.** The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi, *Journal of Stored Products Research* 5,127-141.

## Références bibliographiques

**Aoyama K., Ishikuro E., Nishiwaki M., Ichinoe. 2009.** Zearalenone Contamination and the Causative Fungi in Sorghum. *Journal of Food Hygiene Society of Japan* 50 (2), 47-51.

### B

**Bacha, N., Atoui, A., Mathieu, F., Liboz, T., Lebrihi, A. 2009.** *Aspergillus westerdijkiae* polyketide synthase gene “aoks1” is involved in the biosynthesis of ochratoxin A. *Fungal Genetics and Biology* 46, 77-84.

**Bacon, C.W., Robbins, J.D. and Porter, J.K. 1977.** Media for identifications of *Gibberella zea* and production of F 2 (zearalenone). *Applied and Environmental Microbiology* 32, 445-449.

**Bacon, C. W., Bennett, R. M., Hinton, D. M., Voss, K. A. 1992.** Scanning electron microscopy of *Fusarium moniliforme* within asymptomatic corn kernels and kernels associated with equine leukoencephalomalacia. *Plant Disease* 76, 144-148.

**Baert, K., Valero, A., De Meulenaer, B., Samapundo, S., Ahmed, M.M., Li, B., Debevere, J., Devlieghere, F. 2007.** Modelling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of *Penicillium expansum* in apples. *International Journal of Food Microbiology* 118, 139-150.

**Baggerman, W.I., Samson, R.A. 1988.** Heat resistance of fungal spores. In: Samson, R.A., Hoekstra, E.S. (Eds.), *Introduction to Food-Borne Fungi, third ed. Central bureau Voor Schimmel cultures, Baarn, The Netherlands.*

**Bagneris, R. W., Gaul, J. A., Ware, G. M. 1986.** Liquid chromatography determination of zearalenone and zearalenol in animal feeds and grains, using fluorescence detection. *Journal of Association Organization of Analytical Chemists* 69, 894-898.

**Baliukoniene V., Bakutis B., Stankevicius H. 2003.** Mycological and Mycotoxicological evaluation of grain, *Annals of Agriculture and Environmental Medecine* 10, 223-227

**Balzer, A., Tardieu, D., Bailly, J.D., Guerre, P. 2004.** The trichothecenes: the nature of toxins, natural occurrence in foods and feeds and ways of combating their occurrence. *Revue de Médecine Vétérinaire* 155, 299-314.

**Baranyi J, Roberts T. A. 1993.** non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology* 10, 43-59.

**Baranyi, J., Roberts, T.A. 1994.** A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.

## Références bibliographiques

- Baranyi, J., Tamplin, M. 2004.** ComBase: a common database on microbial responses to food environments. *Journal of Food Protection* 67, 1834-1840.
- Barros, G.G, Garcia, D., Oviedo, S., Ramirez, M.L., Torres A., Chulze, S. 2008.** Deoxynivalenol and nivalenol analysis in soybean and soyflour. *World Mycotoxin Journal* 2, 263-266.
- Batish, V. K., Roy, U., Lal, R., Grover, S. 1997.** Antifungal attributes of lactic acid bacteria - A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17, 2009-2225.
- Bechtel, D. B., Kaleikau, L. A., Gaines, R. L., Seitz, L. M. 1985.** The effects of *Fusarium graminearum* infection on wheat kernels. *Cereal Chemistry* 62, 191-197.
- Begerow, D., Nilsson, H., Unterseher, M., Maier, W. 2010.** Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87, 99-108.
- Belli N, Marin S, Ramos AJ, Sanchis V. 2004a.** Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. *International Journal of Food Microbiology* 96, 19-27.
- Bellí, N., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S. 2004b.** Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology* 38, 72-77.
- Bennett, J. W., Klich, M. 2003.** Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 497-516.
- Bensassi, F., Zaied, C., Abid, S., Hajlaoui, M. R., Bacha, H. 2010.** Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat in Tunisia. *Food Control* 21, 281-285.
- Bhat, R. V., Vasanthi, S. 2003.** Mycotoxin food safety risks in developing countries. Food Safety in Food Security and Food Trade. *Vision 2020 for Food, Agriculture and Environment*, Focus 10, brief 3 of 17, 1-2.
- Bhatnagar, D., Ehrlich, K. C., & Cleveland, T. E. 2003.** Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61, 83-93.
- Birzele, B., Prange, A., Krämer, J. 2000.** Deoxynivalenol and ochratoxin A in German wheat and changes of level in relation to storage parameters. *Food Additives Contaminants* 12, 1027-1035.
- Blackwell, B.A., Gillian, J.T., Savard, M.E., Miller, J.D., Divick, J.P. 1999.** Oxidative deamination of hydrolyzed fumonisin B1 (AP1) by cultures of *Exophiala spinifera*. *Natural Toxins* 7, 31-38.

## Références bibliographiques

- Blinder, E.M., Heidler, D., Schatzmayr, G., Thimm, N., Fuchs, E., Schuh, M., Krska, R., Binder, J. 2000.** Microbial detoxification of mycotoxins in animal feed. In: de Koe, W.J., Samson, R.A., van Egmond, H.P., Gilbert, J., Sabino, M. (Eds.), *Mycotoxins and Phytotoxins in Perspective at the Turn of the Millenium*, Proceedings of the 10th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phytotoxins. Garuj`a, Brazil, May 21-25, pp. 271-277.
- Bluhm, B.H., Woloshuk, C.P. 2005.** Amylopectin induces fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. *MolecularPlant Microbe Interaction* 18, 1333-1339.
- Blumenthal, C.Z. 2004.** Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 39, 214- 228.
- Booth, C., 1971.** The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycology Institute, Kew, Surrey.
- Bosch, U., Mirocha, C.J. 1992.** Toxin production by *Fusarium* species from sugar beets and natural occurrence of zearalenone in beets and beet fibers. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3233-3239.
- Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. 1990.** Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, *Ed. Masson*, Paris
- Boughaleb, N., Souli, M., Karbous, B., Mahjoub, M.E.L. 2006.** Identification et répartition géographique des fusarioses affectant l'épi et le pied du blé dans certaines régions du Nord de la Tunisie. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 36, 512-516
- Boughaleb, N., Souli, M., Ouled Sghaier, H. 2008.** Occurrence and Geographic Distribution of Wheat Fusarium Head Blight and Fusarium Root Rot in Jendouba's Areas of Tunisia. *The African Journal of Plant Science and Biotechnology* 2 (1), 23-26
- Bouslimi, A., Bouaziz, C., Ayed-Boussema, I., Hassen, W., Bacha, H. 2008.** Individual and combined effects of ochratoxin A and citrinin on viability and DNA fragmentation in cultured Vero cells and on chromosome aberrations in mice bone marrow cells. *Toxicology* 251, 1-7.
- Boutrif, E., Jemmali, M., Campbell, A.D., Pohland, A.E. 1977.** Aflatoxin in Tunisian foods and foodstuffs. *Annales de la Nutrition et de l'alimentation* 31, 431-434.

## Références bibliographiques

- Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Cabañes, F.J. 2001.** An easy screening method for fungi producing ochratoxinA in pure culture. *International Journal of Food Microbiology* 71, 139-144.
- Bresler, G., Vaamonde, G., Degrossi, C., Fernández-Pinto, V. 1998.** Amaranth grain as substrate for aflatoxin and zearalenone production at different water activity levels. *International Journal of Food Microbiology* 42, 57-6.
- Brul, S., van Gerwen, S., Zwietering, M. 2007.** Modelling microorganisms in food. *Food Sciences Technology and Nutrition* 86.
- Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P., Backhouse, D. 1994.** Laboratory Manual for *Fusarium* Research, 3rd edition. *University of Sydney*. 133 pp.

## C

- Cahagnier, B., Melcion, D., Richard-Molard, D. 1995.** Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B1 on maize grain as a function of different water activities. *Letters of Applied Microbiology* 20, 247-251.
- Cairns-Fuller, V., Aldred, D., Magan, N. 2005.** Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain, *Journal of Applied Microbiology* 99, 1215-1221.
- Campbell C.K., Johnson E.M., Philpot C.M., Warnock D.W. 1996.** Identification of pathogenic fungi, *Public Health Laboratory Service*.
- Carson, M.S., Smith, T.K. 1983.** Role of bentonite in prevention of T-2 toxicosis in rats. *Journal of Animal Sciences* 57, 1498-1506.
- Castegnaro, M., Pfohl-Leszkowicz, A. 2002.** Les mycotoxines: contaminants omniprésents dans l'alimentaire animale et humaine, dans la sécurité alimentaire du consommateur, Lavoisier, Tec & Doc.
- Castells, M., Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A.J. 2005.** Fate of mycotoxins in cereals during extrusion cooking: a review. *Food Additives and Contaminants* 22, 150-157.
- Castelo, M.M., Bullerman, L.B. 2001.** Reduction of fumonisin by the corn flake process. In: Proceedings of the American Association of Cereal Chemists Annual Meeting, Charlotte, North Carolina, 14-18 October (Abst. no. 362.).
- Chabasse, D., Bouchara, J.P., de Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., Penn, P. 2002.** Les moisissures à intérêt médical. Cahier de formation N° 25. Bioforma 230 bd raspail 75014 Paris.

## Références bibliographiques

- Chagas, G. M., Campello, A. P., & Kluppel, M. L. W. 1992.** Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. Effects on respiration, enzyme activities and membrane potential of renal cortical mitochondria. *Journal of Applied Toxicology* 12, 123-129.
- Chen, J., Mirocha, C.J., Xie, W., Hogge, L.R., Olson, S.C. 1992.** Production of the mycotoxin fumonisin B1 by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 847-852.
- Chiotta, M.L., Susca, A., Stea, G., Mulè, G., Perrone, G., Logrieco, A., Chulze, S.N. 2011.** Phylogenetic characterization and ochratoxin A-Fumonisin profile of black *Aspergillus* isolated from grapes in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 149, 171-176.
- Chirife, J., Buera, M.P. 1994.** Water activity, glass transition and microbial stability in concentrated and semimoist food systems. *Journal of Food Science* 59, 921-927.
- Chu, F. S., Li, G. Y. 1994.** Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 847-852.
- Chung, T. C., Axelsson, L., Lindgren, S. E., Dobrogosz, W. J. 1989.** In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology and Health and Disease* 2, 137-144.
- Clear, R. M., Patrick, S.K. 2000.** *Fusarium* head blight pathogens isolated from *Fusarium*-damaged kernels of wheat in western Canada, 1993 to 1998. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22, 51-60.
- Codex Alimentarius Commission. 2012.** Discussion paper on mycotoxins in Sorghum. Joint FAO/WHO Food Standards Programme CODEX Committee on contaminants in foods' 6th Session held in The Hague, The Netherlands on 26-30 March 2012.
- Commission of the European Communities (CEC). 2002.** Commission Regulation (EC) No. 472/2002 of 12 March 2002 amending Regulation (EC) No. 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, L75, 18-20.
- Commission of the European Communities (CEC). 2005.** Commission Regulation 123/2005 of 26 January 2005 amending Regulation (EC) No. 466/2001 as regards ochratoxin A. *Official Journal of the European Communities* 25, 3-5.

- Commission of the European Communities (CEC). 2006a.** Commission Recommendation No 2006/576 of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Official Journal of the European Union*, L 229, 7-9.
- Commission of the European Communities (CEC). 2006b.** Commission regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of European Union*, 364, 5-24.
- Commission of the European Communities (CEC). 2007.** 1126/2007 of 28 September 2007 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. *Official Journal of the European Journal* L 255, 14-17.
- Commission of the European Communities (CEC). 2010.** Commission Regulation No 165/2010 of February 26 amending regulation (EC) No 1881/2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official Journal of the European Union* L50, 8-10.
- Conkova, E., Laciakova, A., Pastorova, B., Seidel, H., & Kovac, G. 2001.** The effect of zearalenone on some enzymatic parameters in rabbits. *Toxicology Letters* 121, 145-149.
- Corsetti, A., Gobetti, M., Rossi, J., Damiani, P. 1998.** Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50, 253-256.
- Council for Agricultural Science and Technology (CAST). 2003.** Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. Task Force Report no. 139. Ames, Iowa, USA.
- Creppy, E.E. 2002.** Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* 127, 19-28.
- Czaban, J., Wróblewska, B., Stochmal, A., Janda, B. 2006.** Growth of *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A on nonsterilized wheat grain incubated at different temperatures and water content. *Polish journal of microbiology* 55, 321-331.
- Cunha, S. C., Fernandes, J. O. 2010.** Development and validation of a method based on a QuEChERS procedure and heart-cutting GC-MS for determination of five mycotoxins in cereal products. *Journal of Separation Science*, 33(4-5), 600-609.

D

- Dalié, D.K.D., Deschamps, A.M., Richard-Forget, F. 2010.** Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control* 21, 370-380.
- Damoglou, A.P., Downey, G.A. Shannon, W. 1984.** The production of ochratoxin A and citrinin in barley. *Journal of Food and Agriculture* 35, 395-400.
- Dantigny, P., Guilmart, A., Bensoussan, M. 2005.** Basis of predictive mycology. *International Journal of Food Microbiology* 100, 187-196.
- Da Silva, J.B., Pozzi, C.R., Mallozzi, M.A.B., Ortega, E.M., Correa, B. 2000.** Mycoflora and occurrence of aflatoxin B1 and fumonisin B1 during storage of Brazilian sorghum. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48, 4352-4356.
- Da Silva, V.N., Fernandes, F.M.C., Cortez, A., Ribeiro, D.H.B., de Almeida, A.P., Hasegawa, R.H., Corrêa, B. 2006.** Characterization and genetic variability of *Fusarium verticillioides* strains isolated from corn and sorghum in Brazil based on fumonisins production, microsatellites, mating type locus, and mating crosses. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 798-804.
- Davey, K.R. 1989.** A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. *Journal of Applied Bacteriology* 5, 483-488.
- David O. Nkwe, Joanne E. Taylor Bupe A. Siame. 2005.** Fungi, aflatoxins, fumonisin B1 and zearalenone contaminating sorghum-based traditional malt, wort and beer in Botswana. *Mycopathologia* 160, 177-186.
- Davidson, M. P. 2001.** Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & I. J. Montville (Eds.), *Food microbiology: Fundamentals and frontiers* (pp. 385–392). Washington: ASM press.
- Desjardins, A. E., Plattner, R. D., Nelsen, T. C., Leslie, J. F. 1995.** Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (*Zea mays*) seeding. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 79-86.
- Desjardins, A. E., Proctor, R.H. 2001.** Biochemistry and genetics of *Fusarium* toxins. In B. A. Summerell, J. F. Leslie, D. Backhaus, W. L. Bryden, & L. W. Burgess (Eds.), *Fusarium—Paul E. Nelson memorial symposium*. St. Paul, Minnesota, USA: APS Presse , 50-69.

## Références bibliographiques

- Desjardins, A. E. 2006.** *Fusarium* mycotoxins. chemistry, genetics, and biology. St Paul, Minnesota, USA: APS Press.
- Devegowda, G., Raju, M., Swang, H. 1998.** Mycotoxins: novel solutions for their counteraction. *Feedstuffs* 70, 12-15.
- Diener UL, Davis ND. 1966.** Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 56, 1390-1393.
- Diener, U. L., Davis, N. D. 1967.** Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by *Aspergillus flavus* in sterile peanuts. *Journal of American Oil Chemists Society* 44, 259-263.
- Diener, U.L., Cole, R.J., Sanders, T.H., Payne, G.A., Lee, L.S., Klich, M.A. 1987.** Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology* 25, 249-270.
- Divakara, S.T., Santosh, P., Aiyaz, M., Ramana, M.V., Hariprasas, P., Nayaka, S.C, Niranjana, S.R. 2013.** Molecular identification and characterization of *Fusarium* spp. associated with sorghum seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94, 1132-1139.
- D'Mello, J.P.F., MacDonald, A.M.C. 1997.** Mycotoxins; *Animal Feed Science Technology*, 69, 155-166.
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H. 1980.** "Compendium of Soil Fungi". (London): Academic Press.
- Dragacci, S., Zakhia-Rozis, N., Gatlier, P. 2011.** Danger dans l'assiette. Carnets de Sciences. Editions Quae.
- Dupuy, J., Le Bars, P., Boudra, H. 1993.** Thermostability of fumonisin B1, a mycotoxin from *Fusarium moniliforme* in corn. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 2864-2867.
- Duvik, J. 2001.** Prospects for reducing fumonisin contamination of maize through genetic modification. *Environmental Health Perspectives Supplies* 109, 337-342.

## E

- Eaton, D. L., Gallagher, E. P. 1994.** Mechanisms of aflatoxins carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 34, 135-172.
- Edwards, S.G., Pirgozliev, S.R., Hare, M.C., Jenkinson, P. 2001.** Quantification of trichothecene-producing *Fusarium* species in harvested grain by competitive PCR to

## Références bibliographiques

- determine efficacies of fungicides against *Fusarium* head blight of winter wheat. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1575-1580.
- Elbashir, A., Ali, S.E. 2013.** Aflatoxins, ochratoxins and zearalenone in sorghum and sorghum products in Sudan. *Food Additives & Contaminants: Part B: Surveillance*. 7(2), 135-140.
- Eriksen, G. S., Pettersson, H. 2004.** Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 114, 205-239.
- Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Cabañes, F.J. 2004.** Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. *Research in Microbiology* 155, 861-866.
- Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Cabañes, F.J. 2006.** Effect of water activity on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. *International journal of food microbiology* 108, 188-195.
- Etcheverry M., Nesci A., Barros G., Torres A., Chulze S. 1999.** Occurrence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin B1 in corn genotypes and corn meal in Argentina, *Mycopathologia* 147 (1), 37-44
- European Food Safety Authority (EFSA). 2007.** Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *European Food Safety Authority journal*, 446, 1-127.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2011.** Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *European Food Safety Authority journal* 9, 2197.
- European Parliament and Council. 2002.** Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7May 2002 on undesirable substances in animal feed. Official Journal of the European Union, L 140, 10-22.

## F

- Fakhfakh, M.M., Yahyaoui, A., Rezgui, S., Elias, E.M., Daaloul, A. 2011.** Identification and pathogenicity assessment of *Fusarium* spp. sampled from durum wheat fields in Tunisia. *African Journal of Biotechnology* 10, 6529-6539.

## Références bibliographiques

- Fandohan, P., Zoumenou, D., Hounhouigan, D.J., Marasas, W.F.O., Wingfield, M.J., Hell, K. 2005.** Fate of aflatoxins and fumonisins during the processing of maize into food products in Benin. *International Journal of Food Microbiology* 98, 249-259.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2004.** Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003. *FAO Food and Nutrition paper*, Vol. 81. FAO, Rome, Italy.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2011.** Cereal supply and demand brief. In FAO cereal supply and demand situation. (July 2011).
- Fernandez M.R., Huber D., Basnyat P., Zentner R.P. 2008.** Impact of agronomic practices on populations of Fusarium and other fungi in cereal and noncereal crop residues on the Canadian Prairies. *Soil & Tillage Research* 100, 60-71.
- Filali, A., Ouammi, L., Betbeder, A. M., Baudrimont, I., Soulaymani, R., Benayada, A. 2001.** Ochratoxin A in beverages from Morocco: A preliminary survey. *Food Additives and Contaminants* 18, 565-568.
- Filali, A., Brtheder, A.M., Baudrimont, I., Benayada, A., Soueymani, R., Creppy, E.E. 2002.** Ochratoxin A in human plasma in Morocco: A preliminary survey. *Human and Experimental Toxicology* 21, 241-245.
- Fitzgerald, J. M., Collin, R. G., Towers, N. R. 1998.** Biological control of sporidesmin-producing strains of *Pithomyces chartarum* by biocompetitive exclusion. *Letters of Applied Microbiology* 26 (1), 17-21.
- Frank, H.K., Grunewald, T. 1970.** Radiation resistance of aflatoxins. *Food Irradiation* 11, 15-20.
- Frisvad, J.C., Frank, J.M., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Samson, R.A. 2004.** New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology* 50, 23-43.
- Frisvad, J.C., Lund, F., Elmholt, S. 2005.** Ochratoxin A producing *Penicillium verrucosum* isolates from cereals reveal large AFLP fingerprinting variability. *Journal of Applied Microbiology* 98, 684-692.
- Fujikawa, H., Itoh, T. 1996.** Tailing of thermal inactivation curve of *Aspergillus niger* spores. *Applied and Environmental Microbiology* 10, 3745-3749.

G

- Gabal, M.A., Hegazi, S.A., Hassanin, N. 1994.** Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* field isolates. *Veterinary and Human Toxicology* 36, 519-521.
- Gallo, A., Perrone, G., Solfrizzo, M., Epifani, F., Abbas, A., Dobson, A. D. W., Mulé, G. 2009.** Characterisation of a pks gene which is expressed during ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 8-15.
- Garcia, D., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marin, S. 2009.** Predicting mycotoxins in foods: A review. *Food Microbiology* 26, 757-769.
- Garcia D, Ramos AJ, Sanchis V, Marin S. 2011.** Intraspecific variability of growth and patulin production of *Penicillium expansum* isolates at two temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 151, 195-200.
- Gargouri Kammoun, L., Gargouri, S., Hajlaoui, M. R., Marrakchi, M. 2009.** Occurrence and Distribution of *Microdochium* and *Fusarium* Species Isolated from Durum Wheat in Northern Tunisia and Detection of Mycotoxins in Naturally Infested Grain. *Journal of Phytopathology* 157, 546-551.
- Geisen, R., 1996.** Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *Systematics and Applied Microbiology* 19, 388-392.
- Geisen, R., Mayer, Z., Karolewicz, A., & Färber, P. 2004.** Development of a real time PCR system for detection of *Penicillium nordicum* and for monitoring ochratoxin A production in foods by targeting the ochratoxin polyketide synthase gene. *Systematics and Applied Microbiology*, 27, 501-507.
- Gelderblom, W.C., Marasas, W.F., Vleggaar, R., Thiel, P.G., Cawood, M.E. 1992.** Fumonisin: isolation, chemical characterization and biological effects. *Mycopathologia* 117, 11-16.
- Ghali, R., Hmaissia-khlifa, K., Ghorbel, H., Maaroufi, K., Hedili, A. 2008.** Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in tunisian foods. *Food Control* 19, 921-924.
- Ghali, R., Belouaer, I., Hdiri, S., Ghorbel, H., Maaroufi, K., Hedilli, A. 2009a.** Simultaneous HPLC determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in Tunisian sorghum and pistachios. *Journal of Food Composition and Analysis* 22, 751-755.

## Références bibliographiques

- Ghali, R., Hmaissia-Khlifa, K., Ghorbel, H., Maaroufi, K., Hedilli, A. 2009b.** HPLC determination of ochratoxin A in high consumption Tunisian foods. *Food Control* 20, 716-720.
- Ghali, R., H Khlifa, K., Ghorbel, H., Maaroufi, K. Hedilli, A. 2010.** Aflatoxin determination in commonly consumed foods in Tunisia . *Journal of Sciences of Food and Agriculture* 90, 2347-2351.
- Gibson, A.M., Baranyi, J., Pitt, I.J., Eyles, M.J., Roberts, T.A. 1994.** Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology* 23, 419-431.
- Gibson, A.M., Hocking, A.D. 1997.** Advances in the predictive modelling of fungal growth in food. *Trends in Food Science and Technology* 8, 353-358.
- Giorni P, Magan N, Pietri A, Bertuzzi, T. Battilani P. 2007.** Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology* 113, 330-338.
- Giorni P, Magan N, Pietri A, Battilani P. 2011.** Growth and aflatoxin production of an Italian strain of *Aspergillus flavus*: influence of ecological factors and nutritional substrates. *World Mycotoxin Journal*. 4, 425-432.
- Glass, N.L., Donaldson, G.C. 1995.** Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1323-1330.
- Godet, M., Munaut, F. 2010.** Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. *FEMS Microbiology Letters* 304, 157-168.
- Gonzalez, H.H.L., Gonzalez, Martinez, E.J., Resnik, S.L. 1997.** Fungi associated with sorghum grain from Argentina. *Mycopathologia* 139, 35-41.
- Gonzalez Jaén MT, Mirete S, Patino B, Lopez-Errasquin E, Vazquez C. 2004.** Genetic markers for the analysis of variability and for production of specific diagnostic sequences in fumonisin- producing strains of *Fusarium verticillioides*. *European Journal of Plant Pathology* 110 525–532.
- Gourama, H., Bullerman, L.B. 1997.** Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei* pseudoplantarum. *International Journal of Food Microbiology* 34, 131-143.
- Grosso, F., Saïd, S., Mabrouk, I., Fremy, J.M., Castegnaro, M., Jemmali, M., Dragacci, S. 2003.** New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. *Food and Chemical Toxicology* 41(8), 1133-1140.

*H*

- Halouat, E., Debevere, J.M. 1997.** Effect of water activity; modified atmosphere packaging and storage temperature on spore germination of moulds isolated from prunes. *International Journal of Food Microbiology* 35, 41-48.
- Hamid, A.B., Smith, J.E. 1987.** Degradation of aflatoxin by *A. flavus*. *Journal of General Microbiology* 133, 2023-2029.
- Haschek, W.M., Haliburton, J.C. 1986.** *Fusarium moniliforme* and zearalenone toxicoses in domestic animals: a review. In: Richard, J.L., Thurston, J.R. (Eds.), *Diagnosis of Mycotoxicoses. Martinus Nijhoff Publishers, Boston*, pp. 213-215.
- Haugland, R.A., Vesper, S.J. 2000.** Method for identifying and quantifying specific fungi and bacteria. US Patent and Trademark Office, Patent #6,387,652, May 14, 2002, 29 pp.
- He, P., Young, L.G., Forsberg, C. 1992.** Microbial transformation of deoxynivalenol (vomitoxin). *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3857-3863.
- Hector H.L. Gonzfilez, Silvia L. Resnik, and Graciela Vaamonde. 1988.** Influence of temperature on growth rate and lag phase of fungi isolated from Argentine corn. *International Journal of Food Microbiology* 6, 179-183.
- Heena, C.N., Shaw, K.J., Pitt, J.I. 1998.** Ochratoxin A production by *A.carbonarius* and *A.niger* isolates and detection using coconut cream agar. *Journal of Food Mycology* 1, 67-72.
- Heperkan, D., Dazkir, G.S., Kansu, D.Z., Güler, F.K. 2009.** Influence of temperature on citrinin accumulation by *Penicillium citrinum* and *Penicillium verrucosum* in black table olives. *Toxin Reviews*. 28, 180-186.
- Hesseltine, C.W., Vandegrift, E., Fennell, D., Smith, M.L., Shotwell, O.L. 1972.** Aspergilli as Ochratoxin producers. *Mycologia* 64, 539-550.
- Hocking, A.D., Pitt, J.I. 1979.** Water relations of some *Penicillium* species at 25°C. *Transactions of the British Mycology Society* 73, 141-145.
- Hocking, A.D. 2006.** *Aspergillus* and related teleomorphs. *Food Science Australia*. Woodhead Publishing 451-487.
- Horie, Y. 1995.** Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*, *Nippon Kingakukai Kaiho* 36, 73-76.

## Références bibliographiques

- Horn, B.W., Wicklow, D.T. 1983.** Factors influencing the inhibition of aflatoxin production in corn by *Aspergillus niger*, *Canadian Journal of Microbiology* 29, 1087-1091.
- Horn B.W. 2005.** Colonization of wounded peanut seeds by soil fungi: Selectivity for species from *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycologia*. 97 (1), 202-217.
- House, J.D., Nyachoti, C.M., Abramson, D. 2003.** Deoxynivalenol removal from barley intended as swine feed through the use of an abrasive pearling procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 5172-5175.
- Hubert, J., Stejskal, V., Munzbergová, Z., Kubátová, A., Vánová, M., Zd'árková, E. 2007.** Mites and fungi in heavily infested stores in the Czech Republic, *Journal of Economic Entomology* 97 (6), 2144-2153.
- Humpf, H.U., Voss, K.A. 2004.** Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. *Molecular Nutrition and Food Research* 48, 255-269.
- Hunter, J.H. 1969.** Growth and aflatoxin production in shelled corn by the *Aspergillus flavus* group as related to relative humidity and temperature. Ph.D. Thesis, Purdue University Diss. Abstract. 30, 1447B.
- Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O., Dutler, H. 2001.** Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters* 122, 179–188.

## I

- INNORPI. 1983.** List of Maximum Concentrations of Contaminants and Undesirable Substances. *Tunisian Standard NT 117.02*.
- International Agency for Research on Cancer, IARC. 1993.** Evaluation of carcinogenic risks of chemical to humans. In 'Some naturally-occurring substances: Food Items and Constituents'. Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. *IARC monographs, Vol 56 Lyon, France, 359-362*.
- International Agency for Research on Cancer, IARC. 1999.** Monographs on the overall evaluations of carcinogenicity to humans. *IARC monographs, Vols. 1-73 Lyon, France, 1-36*.
- International Agency for Research on Cancer, IARC. 2002.** Monograph on the Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. *Summary of Data Reported and Evaluation, Vol. 82 Lyon, France, 171-175*.

## Références bibliographiques

**Isakeit, T., Prom, L.K., Wheeler, M., Puckhaber, L.S., Liu, J. 2008.** Mycotoxigenic potential of ten *Fusarium* species grown on sorghum and *in vitro*. *Plant Pathology Journal* 7, 183-186.

### J

**Jackson, L.S., Bullerman, L.B. 1999.** Effect of processing on *Fusarium* mycotoxins. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 459, 243-261.

**Janardhana G.R., Raveesha K.A., Shetty H.S. 1999.** Mycotoxin contamination of maize grains grown in Karnataka (India). *Food Chemistry and Toxicology*. 37, 863-868.

**Jarvis, B.B., Miller, J.D. 2005.** Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66, 67-372.

**Jiménez, M., Máñez, M., Hernández, E. 1996.** Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. *International Journal Food Microbiology* 29, 417-421.

**Jimenez, M., Mateo, J.J., Hinojo, M.J., Mateo, R. 2003.** Sugars and amino acids as factors affecting the synthesis of fumonisins in liquid cultures by isolates of the *Gibberella fujikuroi* complex. *International Journal of Food Microbiology* 89, 185-193.

**Jina, P. G., Han, Z., Cai, Z. X., Wu, Y. J., & Ren, Y. P. 2010.** Simultaneous determination of 10 mycotoxins in grain by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using <sup>13</sup>C<sub>15</sub>-deoxynivalenol as internal standard. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 27(12), 1701-1713.

**Johanning, E., Gareis, M., Nielsen, K., Dietrich, R., Martlbauer, E. 2002.** Airborne Mycotoxin Sampling and Screening Analysis. Rotterdam (Netherlands). Indoor Air 2002- 9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate. *In-house publishing*, p: 1-6.

**Jones, R.K., Duncan, H.E., Hamilton, P.B. 1981.** Planting date, harvest date, irrigation effects on infection and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in field corn. *Phytopathology* 71, 810-816.

**Joosten, H.M.L.J., Goetz, J., Pittet, A., Schellenberg, M., Bucheli, P. 2001.** Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. *International Journal of Food Microbiology* 65, 39-44.

**Jouany, J.P. 2007.** Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology* 137, 342-362.

## Références bibliographiques

**Jurado, M., Vázquez, C., Callejas, C., González-Jaén, M.T. 2006.** Occurrence and variability of mycotoxigenic *Fusarium* species associated to wheat and maize in the South of Spain. *Mycotoxin Research* 22, 87-91.

### K

**Kandler, O. 1983.** Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antoine van Leuwenhoek* 49, 202-224.

**Keller, S.E., Sullivan, T.M., Chirtel, S. 1997.** Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B<sub>1</sub>: oxygen and pH. *Industrial Microbiology, Biotechnology*. 19, 305-309.

**Keller, L.A.M., Pereyra, C.M., Cavaglieri, L.R., Keller, K.M., Almeida, T.X., Deveza, M.V., Assad, R.Q., Rosa, C.A.R. 2012.** Fungi and Aflatoxin B<sub>1</sub> in pre and post-fermented sorghum trench type silos destined to bovine intensive-rearing in Brazil. *Revista Biociencias* 2, 81-91.

**Kiffer, E., M. Morelet. 1997.** Les deutéromycètes. Institut National de la Recherche Agronomique.

**Klich, M.A. 2007.** Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience* 48, 71-80.

**Koch, A.L. 1975.** The kinetics of mycelial growth. *Journal of General Microbiology* 89, 209-216.

**Kollarczik, B., Gareis, M., Hanelt, M. 1994.** In vitro transformation of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone by the normal gut microflora of pigs. *Natural Toxins* 2, 105-110.

**Kosiak, E.B., Holst-Jensen, A., Rundberget, T., González-Jaén, M.T., Torp, M. 2005.** Morphological, chemical and molecular differentiation of *Fusarium equiseti* isolated from Norwegian cereals. *International Journal of Food Microbiology* 99, 195-206.

**Kottapalli, B., Wolf-Hall, C.E., Schwarz, P., Schwarz, J., Gillespie, J. 2003.** Evaluation of hot water and electron beam irradiation for reducing *Fusarium* infection in malting barley. *Journal of Food Protection* 66, 1241-1246.

**Kpodo K., Thrane U., Hald B. 2000.** Fusaria and fumonisins in maize from Ghana and their co-occurrence with aflatoxins. *International Journal Food Microbiology*, 61(33), 147-157.

## Références bibliographiques

- Kristensen, R., Torp, M., Kosiak, B., Holst-Jensen, A. 2005.** Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycology Research* 109, 173–186.
- Kurata, H. 1990.** Mycotoxins and mycotoxicoses. IN A. E. Pohland, V.R. Dowell, & J.L. Richards (EDs.), *Microbial toxins in foods and feeds*. New York, USA: Plenum Press, 249-259.
- Kurtzman, C.D., Horn, B.W., Hesseltine, C.W. 1987.** *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 53, 158-174.
- ℒ*
- Lacey, J. 1986.** Factors affecting mycotoxin production. In: *Mycotoxins and phycotoxins* (edited by Steyn, P.S. and Vlegaar, R.), 6th International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins, Pretoria, South Africa.
- Lacey, J., Ramakrishna, N., Hamer, A., Magan, N., Marfleet, I.C. 1991.** Grain fungi. In: Arora, D.K., Mukerji, K.G., Marth, E.H. (Eds.), *Handbook of Applied Mycology, Vol III, Foods and Feeds*. Marcel Dekker, New York, pp. 121-127.
- Lahlali, R., Serrhini, M.N., Jijakli, M.H. 2005.** Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *Penicillium expansum*. *International Journal Food Microbiology* 103, 315-322.
- Langseth, W., Bernhoft, A., Rundberget, T., Kosiak, B., Gareis, M. 1999.** Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia* 144, 103-113.
- Lasram, S., Oueslati, S., Valero, A., Marin, S., Ghorbel, A., Sanchis, V. 2010.** Water Activity and Temperature Effects on Fungal Growth and Ochratoxin A Production by Ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* Isolated from Tunisian Grapes. *Journal of Food Science* 75(2), 89-97.
- Lasram, S., Oueslati, S., Mliki, A., Ghorbel, A., Silar, P., Chebil, S. 2012.** Ochratoxin A and ochratoxigenic black *Aspergillus* species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. *Food Control* 25, 75-80.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., Gobetti, M. 2000.** Purification and characterization of novel antifungal compounds from sourdough

## Références bibliographiques

- Lactobacillus plantarum* strain 21 B. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4084-4090.
- Le Bars, J., Le Bars, J., Dupuy, J., Boudra, H. 1994.** Biotic and abiotic factors in fumonisin B1 production and stability. *Journal Association of Official Analytical Chemists* 77, 517-521.
- Lefeyedi, M.L., Marais, G.J., Dutton, M.F., Taylor, J.R.N. 2005.** The microbial contamination, toxicity and quality of turned and unturned outdoor floor malted sorghum. *Journal of the Institute of Brewing* 111, 190-196.
- Leong, S.L., Hocking, A.D., Scott, E.S. 2006.** Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium. *International Journal of Food Microbiology* 110, 209-216.
- Leslie, J. F., Pearson, C. A. S., Nelson, P. E., Toussoun, T. A. 1990.** *Fusarium* spp. from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology*, 80, 343-350.
- Leslie, J.F., Zeller, K.A., Lamprecht, S.C., Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O. 2005.** Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. *Phytopathology* 95, 275-283.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A. 2006.** The *Fusarium* Laboratory Manual, first ed. Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- Li, F., Xu, G., Li, Y., Chen, Y. 2003.** Study on the production of citrinin by *Monascus* strains used in food industry. *Wei Sheng Yan Jiu* 32 , 602-605.
- Lin, M.T., Dianese, J.C. 1976.** A coconut agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology* 66, 1466-1469.
- Lindblad, M., Johnsson, P., Jonsson, N., Lindqvist, R., Olsen, M. 2004.** Predicting noncompliant levels of ochratoxin A in cereal grain from *Penicillium verrucosum* counts. *Journal of Applied Microbiology* 97, 609-616.
- Lindgren, S., Dobrogosz, W. 1990.** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Review* 87, 149-163.
- Lincy S. V. Chandrashekar A. Narayan Rajan Sharma M. S. Thakur R. P. 2011.** Natural occurrence of trichothecene-producing Fusaria isolated from India with particular reference to sorghum. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 981-989.

## Références bibliographiques

- Liu, B. H., Yu, F. Y., Wu, T. S., Li, S. Y., Su, M. C. Wang, M. C., Shih, S.M. 2003.** Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 191, 255-263.
- Llorens, A., Mateo, R., Hinojo, M.J., Logrieco, A., Jimenez, M. 2004.** Influence of the Interactions among Ecological Variables in the Characterization of Zearalenone Producing Isolates of *Fusarium* spp. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 253-260.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A., Perrone, G. 2003.** Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology* 109, 645-667.
- Lund, F., Frisvard, J.C. 2003.** *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology* 95, 1117-1123.

## M

- Maaroufi, K., Achour, A., Betbeder, A. M., Hammami, M., Ellouz, F., Creppy, E. E. 1995.** Foodstuffs and human blood contamination by ochratoxin A: A correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia. *Archives of Toxicology* 69, 552-558.
- Maaroufi, K., Achour, A., Zakhama, A., Ellouz, F., El may, M., Creppy, E.E., Bacha, H. 1996.** Human nephropathy related to ochratoxin A in Tunisia. *Journal of Toxicology* 15, 223-237.
- Mabrouk, I., Bourfifa, Z., Mosbeh, A.F., Korbi, S., Jemmali, M. et Saïd, S. 2000.** Rôle de l'Ochratoxine A et d'autres facteurs dans le développement des tumeurs de la vessie chez des patients tunisiens : Etude de cas/témoins. *Microbiologie et Hygiène Alimentaire* 12, (35). 10-13.
- Magan, N., Lacey, J. 1984.** Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. *Transactions of British Mycology Society* 82, 71-81.
- Magan, N. 2007.** Fungi in extreme environments, In C. P. Kubicek and I. S. Druzhinia (eds.), *The Mycota. IV. Environmental and microbial relationships*. Springer Verlag, Berlin, Germany 85-103.
- Magan, N., Medina, A., Rodriguez, A. 2015.** Mycotoxins, climate change and food security: do we know enough? Applied Mycology Group. Agrifood Institute, Cranfield, Bedford MK43 0AL, U.K. Published on 4 may 2015.

## Références bibliographiques

- Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J., Schnürer, J. 2003.** Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 219, 129-135.
- Malone, B.M., Richard, J.L., Romer, A.S., Johnsson, A.S., Whitaker, T. 1998.** Fumonisin reduction in corn by cleaning during storage discharge. In: O'Brien, L., Blakeney, A.B., Ross, A.S., Wrigley, C.W. (Eds.), *Cereals 98, Proceedings of the 48th Australian Cereal Chemistry Conference*. Royal Australian Chemical Institute. North Melbourne, Australia, August, pp. 372-379.
- Mandal, V., Sen, S.K., Mandal, N.C. 2007.** Detection, isolation and partial characterization of antifungal compound(s) produced by *Pediococcus acidilactici* LAB 5. *Natural Product Communications* 2, 671-674.
- Marasas, W.F.O., Nelson, P.E., Toussoun, T.A. 1984.** *Toxigenic Fusarium Species. Identity and Mycotoxicology*. The Pennsylvania State University Press, University Park.
- Marasas, W.F.O., Burgess, L.W., Anelich, R.Y., Lamprecht, S.C., van Schalkwyk, D.J. 1988a.** Survey of *Fusarium* species associated with plant debris in South African soils. *South African Journal of Botany* 54, 63-71.
- Marasas, W.F., Kellerman, T.S., Gelderblom, W.C., Coetzer, J.A., Thiel, P.G., Van Der Lugt, J.J. 1988b.** Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 55, 197-203.
- Marín, S., Sanchis, V., Teixido, A., Saenz, R., Ramos, A.J., Vinas, I., Magan, N. 1996.** Water and temperature relations and microconidial germination of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from maize. *Canadian Journal of Food Microbiology* 42, 1045-1050.
- Marín, S., Sanchis, V., Sáenz, R., Ramos, A.J., Vinas, I., Magan, N. 1998a.** Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from corn grain. *Journal of Applied Microbiology* 84, 25-36.
- Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., Vinas, I., Magan, N. 1998b.** Environmental factors, in vitro interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research* 102, 831-837.

## Références bibliographiques

- Marín, S., Magan, N., Serra, J., Ramos, A.J., Canela, R., Sanchis, V. 1999a.** Fumonisin B1 production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize, wheat, and barley grain. *Journal of Food Science* 64, 921-924.
- Marín, S., Magan, N., Bellí, N., Ramos, A.J., Canela, R., Sanchis, V. 1999b.** Two dimensional profiles of fumonisin B production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modelling toxin formation in maize grain. *International Journal of Food Microbiology* 51, 159-167.
- Marín, S., Belli, N., Lasram, S., Chebil, S., Ramos, A.J., Ghorbel, A., Sanchis, V. 2006.** Kinetics of Ochratoxin A Production and Accumulation by *Aspergillus carbonarius* on Synthetic Grape Medium at Different Temperature Levels. *Journal of Food Science* 71 (6), 196-200.
- Marín, S., Hodžić, I., Ramos, A.J., Sanchis, V. 2008.** Predicting the growth/no-growth boundary and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in pistachio nuts. *Food Microbiology* 25, 683-689.
- Marín, S., Colom, C., Sanchis, V., Ramos, A.J. 2009.** Modelling of growth of aflatoxigenic *A. flavus* isolates from red chilli powder as a function of water availability. *International Journal of Food Microbiology* 128, 491-496
- Marín, P. 2010.** Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de *Fusarium*. PhD Thesis. University Complutense of Madrid.
- Marín, P., Jurado, M., Magan, N., Vázquez, C., González-Jaén, M.T. 2010.** Effect of solute stress and temperature on growth rate and TRI5 gene expression using real time RT-PCR in *Fusarium graminearum* from Spanish wheat. *International journal of food microbiology* 140, 169-174.
- Marks, B.P. 2007.** Status of microbial modelling in food process models. *Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety* 7, 137-143.
- Masimango, N., Remacle, J., Ramaut, J. 1979.** Elimination of aflatoxin B1 by clays from contaminated substances. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation* 33, 137-147.
- Mayer, Z., Bagnara, A., Färber, P., Geisen, R. 2003.** Quantification of the copy number of nor-1, a gene of the aflatoxin biosynthetic pathway by real-time PCR, and its correlation to the cfu of *Aspergillus flavus* in foods. *International Journal of Food Microbiology* 82, 143-151.

## Références bibliographiques

- McMeekin, T., Bowman, J., McQuestin, O., Mellefont, L., Ross, T., Tamplin, M. 2008.** The future of predictive microbiology: strategic research, innovative applications and great expectations. *International Journal of Food Microbiology* 128, 2-9.
- Medina-Martinez M.S., Martinez A.J. 2000.** Mold occurrence and aflatoxin B1 and Fumonisin B1 determination in corn samples in Venezuela. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (7), 2833-2836.
- Medina A., Valle-Algarra F.M. , Mateo R., Gimeno-Adelantado J.V., Fernando Mateo F., Jiménez M. 2006.** Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology* 108 (2), 196-203.
- Membré, J.M., Lambert, R.J.W., 2008.** Application of predictive modelling techniques in industry: from food design up to risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* 128, 10-15.
- Milano, G.D., López, T.A. 1991.** Influence of temperature on zearalenone production by regional strains of *Fusarium graminearum* and *Fusarium oxysporum* in culture. *International Journal of Food Microbiology* 13, 329-334.
- Miller, J.D. 1992.** Fungi as contaminants in indoor air. *Atmospheric Environment journal*, 26, 2163-2172.
- Miller, J. D. 1995.** Fungi and mycotoxins in grain: Implications for stored product research. *Journal of Stored Product Research* 31, 1-16.
- Miller Vincent, R. 2001.** Mycotoxins in Mold-Colonized Drywall Obtained from a Field Investigation. Aetotech Laboratories, Inc. Phoenix Arizona.
- Miraglia, M., Marvin, H.J.P., Kleter, G.A., Battilani, P., Brera, C., Coni, E., Cubadda, F., Croci, L., De Santis, B., Dekkers, S., Filippi, L., Hutjes, R.W.A., Noordam, M.Y., Pisante, M., Piva, G., Prandini, A., Toti, L., van den Born, G.J., Vespermann, A. 2009.** Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology* 47, 1009-1021.
- Mislivec, P.B., Trucksses, M.W., Stoloff, L. 1988.** Effect of other toxigenic mold species on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in sterile broth shake culture, *Journal of Food Protection* 51, 449-451.
- Mitchell, D., Aldred, D., Magan, N. 2003.** Impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* from different regions of Europe. *Aspects of Applied Biology* 68, 109-116.

## Références bibliographiques

- Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D., Magan N. 2004.** Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology* 97, 439-445.
- Mohale, S., Magan, N., Medina, A. 2013.** Comparison on growth, nutritional utilisation patterns, and niche overlap indices of toxigenic and atoxigenic *Aspergillus flavus* strains. *Fungal Biology* 117, 650-659.
- Molinié, A., Faucet, V., Castegnaro, M., & Pfohl-Leszkowicz, A. 2005.** Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B1: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. *Food Chemistry* 92, 391-400.
- Monaci, L., Palmisano, F. 2004.** Determination of ochratoxin A in foods: state of the art and analytical challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378 , 96-103.
- Montani, M.L., Vaamonde, G., Resnik, S.L., Buera, P. 1988a.** Water activity influence on aflatoxin accumulation in corn. *International Journal of Food Microbiology* 6, 349-353.
- Montani, M.L., Vaamonde, G., Resnik, S.L., Buera, P. 1988b.** Temperature influence on *Penicillium citrinum* Thom growth and citrinin accumulation kinetics. *International Journal of Food Microbiology* 7, 115-122.
- Morin O. 1994.** *Aspergillus* et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques Encyl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), *Maladies infectieuses* 8-600-A-10.
- Mousa. W, Ghazali. F.M. , Jinap. S., Ghazali. H.M. and Radu. S. 2011.** Modelling the effect of water activity and temperature on growth rate and aflatoxin production by two isolates of *Aspergillus flavus* on paddy. *Journal of applied microbiology* 111, 1262-1274
- Mulé G, Gonzalez Jaén MT, Hornok L, Nicholson P, Waalwijk C. 2005.** Advances in molecular diagnosis of toxigenic *Fusarium* species: a review. *Food Additives and Contaminants* 22, 316-323.
- Mulè, G., Susca, A., Logrieco, A., Stea, G., Visconti, A. 2006.** Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes. *International Journal of Food Microbiology* 111, 28-34.
- Munkvold, G. P., McGee, D. C., Carlton, W. M. 1997.** Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 87, 209-217.

*N*

- Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O. 1983.** *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania state Univ. editor
- Nguyen, M.T., Tozlovanu, T., Tran, T.L., Pfohl-Leszkowicz, A. 2007.** Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. *Food Chemistry* 105 (1), 42-47.
- Nielsen, P. V., de Boer, E. 2000.** Food preservatives against fungi. In R. A. Samson, E. S. Hoekstra, J. C. Frisvad, & O. Filtenborg (Eds.), Introduction to food-and airborne fungi. Utrecht: Centraal Bureau voor Schimmelcultures. pp. 357-363.
- Niessen, L. 2007.** PCR based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi, *International Journal of Food Microbiology* 119 (1-2), 38-46.
- Nirenberg, H.I. 1990.** Recent advances in the taxonomy of *Fusarium*. *Studies in Mycology* 32, 91-101.
- Nkwe, D.O., Taylor, J.E., Siame, B.A. 2005.** Fungi, aflatoxins, fumonisin B1 and zearalenone contaminating sorghum-based traditional malt, wort and beer in Botswana. *Mycopathologia* 160, 177-186.
- Norred, W.P., Voss, K.A., Bacon, C.W., Riley, R.T. 1991.** Effectiveness of ammonia treatment in detoxification of fumonisin-contaminated corn. *Food and Chemical Toxicology* 29, 815-819.
- Northolt, M.D., Van Egmond, H.P., Paulsch, W.E. 1977.** Differences between *Aspergillus flavus* strains in growth and aflatoxin B1 production in relation to water activity and temperature. *Journal of food protection* 11 (4), 778-781.

*O*

- O'Callaghan, J., Caddick, M. X., Dobson, A. D. W. 2003.** A polyketide synthase gene required for ochratoxin biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology*, 149, 3485-3491.
- O'Donnell, K. 1993.** *Fusarium* and its near relatives. The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics Reynolds DR & Taylor JW, CAB International, Wallingford.
- O'Donnell, K., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., Gueidan, C., Crous, O.W., Geiser, D.M. 2009.** Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum-Fusarium equiseti* and *F.*

## Références bibliographiques

- chlamydosporum* species complexes within the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 3851-3861.
- O'Donnell K, Humber RA, Geiser DM, Kang S, Park B, Robert VARG, Crous PW, Johnston PR, Aoki T, Rooney AP, Rehner SA. 2012.** Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via *FUSARIUM*-ID and *Fusarium* MLST. *Mycologia* 104, 427-445.
- Olivier, R.E., Cai, X., Friesen, T. L., Halley, S., Stack, R. W., Xu, S.S. 2008.** Evaluation of *Fusarium* Head Blight Resistance in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.). *Crop Science* 48, 213-222.
- Olsen, M., Jonsson, N., Magan, N., Banks, J., Fanelli, C., Rizzo, A., Haikar, A., Dobson, A., Frisvad, J., Holmes, S., Olkku, J., Persson, S.J., Börjesson, T. 2003.** Prevention of Ochratoxin A in Cereals. OTA PREV. Final report. Quality of Life and Management of Living Resources. Project No. QLK1-CT-1999-00433.
- Olutiola, P.O. 1976.** Cellulase enzymes in culture filtrates of *Aspergillus flavus*. *Transactions of the British Mycology Society* 67, 265-268.
- Ono E.Y., Sugiura Y., Homechin M., Kamogae M., Vizzoni E., Ueno Y., Hirooka E.Y. 1999.** Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Panama, Brazil. *Mycopathologia*. 147 (3), 139-148.
- Ono, E.Y., Sasaki, E.Y., Hashimoto, E.H., Hara, L.N., Correa, B., Itano, E.N., Sugiura, T., Ueno, Y., Hirooka, E.Y. 2002.** Post-harvest storage of corn: effect of beginning moisture content on mycoflora and fumonisin contamination. *Food Additives & Contaminants* 19, 1081-1090.
- Oueslati, S., Blesa, J., Molto, J.C., Ghorbel, A., Mañes, J. 2014.** Presence of mycotoxin in sorghum and intake estimation in Tunisia. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 31, 307-318.

## P

- Palacios, S., Ramirez, M. L., Cabrera Zalazar, M., Farnochi, M. C., Zappacosta, D., Chiacchiera, S. M., et al. 2011.** Occurrence of *Fusarium* spp. and fumonisin in durum wheat grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (22), 12264-12269.
- Pardo E, Marin S, Sanchis V, Ramos, AJ. 2004.** Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity. *International Journal of Food Microbiology* 95, 79-88.

## Références bibliographiques

- Park, D.L., Lopez-Garcia, R., Trullo-Preciado, S., Price, R.L. 1996a.** Reduction of risks associated with fumonisin contamination in corn. In: Jackson, L.S., Devries, J.W., Bullerman, L. (Eds.), *Fumonisin in Food*. Plenum Press, New York, pp. 335-344.
- Park J.J., Smalley E.B., Chu F.S. 1996b.** Natural Occurrence of *Fusarium* Mycotoxins in Field Samples from the 1992 Wisconsin Corn Crop. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (5), 1642-1648.
- Parra, R., Magan, N. 2004.** Modelling the effect of temperature and water activity on growth of *Aspergillus niger* strains and applications for food spoilage moulds. *Journal of Applied Microbiology* 97, 429-438.
- Patriarca, A., Vaamonde, G., Ferná'ndez Pinto, V., Comerio, R. 2001.** Influence of water activity and temperature on the growth of *Wallemia sebi*: application of a predictive model. *International Journal of Food Microbiology* 68, 61-67.
- Pena, A., Seifrtova, M., Lino, C., Silveira, I., Solich, P. 2006.** Estimation of ochratoxin A in Portuguese population: New data on the occurrence in human urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1449-1454.
- Perry, J.J., Staley, J.T., Lory, S. 2004.** Microbiologie. Dunod. France.
- Pestka, J. J. 2007.** Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and health risks *Fusarium* and their In D. P. Morgavi & R. T. Riley (Eds.), *toxins: Mycology, occurrence toxicity, control and economic impact*. *Animal feed science and technology*. 137, 283-298.
- Pfohl-Leszkowicz, A. 1999.** Métabolisation des mycotoxines- Effets biologiques et pathologies- Ecotoxicogénèse. Dans « Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque » de Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. *Technique et Documentation*, Paris, pp. 18- 35.
- Pfohl-Leszkowicz, A. 2001.** Définition et origines des mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque, Ed. Tec & Doc, 3-14.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T.K., Chernozemsky, I.N., Castegnaro, M. 2002.** Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumors: A review on etiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*. 19, 282-302.
- Phillips, T.D., Sarr, A.B., Clement, B.A., Kubena, L.F., Harvey, R.B. 1991.** Prevention of aflatoxicosis in farm animals via selective chemisorption of aflatoxin. In: Bray, G.A., Ryan, D.H. (Eds.), *Mycotoxins, Cancer and Health*, vol. 1. Louisiana State University Press, Baton Rouge, pp. 223-237.

## Références bibliographiques

- Phillips, T.D., Clement, B.A., Park, D.L. 1994.** Approaches to reduction of aflatoxin in foods and feeds. In: Eaton, L.D., Groopman, J.D. (Eds.), *The Toxicologie of Aflatoxins: Human Health, Veterinary Agricultural Significance*. Academic Press, New York, pp. 383-406.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. 1985.** *Fungi and Fungal Spoilage*. Orlando, Academic Press.
- Pitt, J. 1987.** *Penicillium viridicatum, Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology* 35, 266-269.
- Pitt J.I. 1988.** Laboratory guide to common *Penicillium* species, Academia Press editor, London.
- Pitt, R.E. 1993.** A descriptive model of mold growth and aflatoxin formation as affected by environmental conditions. *Journal of Food Protection* 2, 139-146.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., Bhudhasmai, K., Miscamble, B.F., Wheeler, K.A., Tanboon-EK, P. 1994.** The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. *International Journal of Food Microbiology* 23, 35-53.
- Pitt JI, Miscamble BF. 1995.** Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *Journal of Food Protection* 58, 86-90.
- Pitt, J. I., Hocking, A.D. 1997.** *Fungi and food spoilage* (2nd ed.). London: Blackie Academic and Professional.
- Pitt, J.I., Basílico, J.C., Abarca, M.L., Lopez, C. 2000.** Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*. 38, 41-46.
- Pitt, D. B., Plestina.J.I, Shepard, R., Solfrizzo, G., Verger, M., Walker, P.J.P. 2001.** Safety evaluation of certain mycotoxins in food. In *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) Rome: Food and Agriculture Organization*, pp. 281.
- Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F., MacDonald, A.M.C. 1999.** A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78, 21-37.
- Prandini, A., Sigolo, A., Filippi, L., Battilani, P., Piva, G. 2008.** Review of predictive models for *Fusarium* head blight and related mycotoxin contamination in wheat. *Food and Chemical Toxicology* 47, 927-931.
- Priyanka, S.R., Venkataramana, M., Kumar, G.P., Rao, V.K., Murali, H.C.S., Batra, H.V. 2014.** Occurrence and molecular detection of toxigenic *Aspergillus* species in

## Références bibliographiques

food grain samples from India. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94, 537-543.

**Prom, L.K., Isakeit, T., Perumal, R., Erpelding, J.E., Rooney, W., Magill, C.W. 2011.** Evaluation of the Ugandan sorghum accessions for grain mold and anthracnose resistance. *Crop Protection* 30, 566-571.

## R

**Rabie CJ, Smalley EB. 1965.** Influence of temperature on the production of aflatoxin. Symposium on mycotoxins in foodstuffs, Pretoria. Agricultural Aspects. Pretoria, Dept. Agric. Tech. Serv. Session 2: 18-29.

**Ramos, A.J., N. Labernia, S. Marín, V. Sanchis, N. Magan. 1998.** Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxine production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. *International Journal of Food Microbiology*. 44, 133-140.

**Raper K., Fennell D.J. 1965.** The genus *Aspergillus*”, Williams and Wilkins editors, Baltimore.

**Ratnavathi, C.V., Sashidhar, R.B. 2003.** Substrate suitability of different genotypes of sorghum in relation to *Aspergillus* infection and aflatoxin production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 3482- 3492.

**Ratnavathi, C.V., Komala, V.V, Kumar, B.S.V., Das, I.K., Patil, J.V. 2011.** Natural occurrence of aflatoxin B1 in sorghum grown in different geographical regions of India. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92, 2416-2420.

**Ratkowsky, D., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, A.N., Chandler, R.E. 1983.** Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *Journal of Bacteriology* 154, 1222-1226.

**Reiss, J. 1986.** Schimmelpilze. Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. Springer, Berlin.

**Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Shepard, G.S., Van Schalkwyk, D.J. 1992.** *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human oesophageal cancer in Transkei. *Phytopathology*. 82, 353-357.

**Ritieni, A., Monti, S.M., Moretti, A., Logrieco, A., Gallo, M., Ferracane, R., Fogliano, V. 1999.** Stability of fusaproliferin, a mycotoxin from *Fusarium* spp. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 1676-1680.

## Références bibliographiques

- Rodrigues, I., Naehrer, K. 2012.** A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. *Toxins* 4, 663-675.
- Rodriguez-Herrera R, Waniska RD, Rooney WL. 1999.** Antifungal proteins and grain mold resistance in sorghum with non-pigmented testa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 4802-4806.
- Roquebert M.F. 1998.** Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation ; Identification”, in “*Moisissures des aliments peu hydratés*”, Ed. Tec & Doc, 39-95.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P. 1993.** An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *Journal of Theoretical Biology* 162, 447-463.
- Rosso, L., Robinson, T.P. 2001.** A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. *International Journal of Food Microbiology* 63, 265-273.
- Ryu, D., Bullerman, L.B. 1999.** Effect of cycling temperatures on the production of deoxynivalenol and zearalenone by *Fusarium graminearum* NRRL 5883. *Journal of Food Protection* 62, 1451-1455.

## S

- Said, S., Feki, H. 1996.** Détection et dosage de l'Aflatoxine B1 et de l'Ochratoxine A dans certains produits alimentaires. Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur Technicien. Ecole Nationale des Ingénieurs de Sfax. Département de Génie Biologique.
- Said, S., Mabrouk, I., Jemmali, M. 1998.** Aflatoxin in Tunisian grain and foods results of 4 years of the expert appraisal. IIIrd International Symposium of Monastir 2. Environnemental toxicants and pathologies.
- Samapundo, S., Devlieghere, F., de Meulenaer, B., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J.M. 2005.** Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on corn. *International Journal of Food Microbiology* 105, 35-52.
- Samapundo S, Devlieghere F, Geeraerd AH, De Meulenaer B, Van Impe JF, Debevere J.M. 2007.** Modelling of the individual and combined effects of water activity and

## Références bibliographiques

- temperature on the radial growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on corn. *Food Microbiology* 24, 517-529.
- Samson, R.A., Eckhardt, C., Orth, R. 1977.** The taxonomy of *Penicillium* species from fermented cheeses. *Antonie Van Leeuwenhoek* 43, 341-350.
- Sangare-Tigori, B., Moukha, S., Kouadio, H.J., Betbeder, A.M., Dano, D.S., Creppy, E.E. 2006.** Co-occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub>, fumonisin B<sub>1</sub>, ochratoxin A and zearalenone in cereals and peanuts from Côte d'Ivoire. *Food Additives & Contaminants* 10, 1000-1007.
- Sanchis, V., Magan, N. 2004.** Environmental conditions affecting mycotoxins. Mycotoxins in food. Detection and control. A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, technology and Nutrition, pp: 174-189.
- Sautour, M., Dantigny, P., Divies, C., Bensoussan, M. 2001.** A temperature-type model for describing the relationship between fungal growth and water activity. *International Journal of Food Microbiology* 67, 63-69.
- Sautour, M., Mansur, C.S., Divies, C., Bensoussan, M., Dantigny, P. 2002.** Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 28, 311-316.
- Scaff, R. M. C., Scussel, V. M. 2004.** Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn-based products commercialized in the state of Santa Catarina, Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47, 911-919.
- Schell, T.C., Lindemann, M.D., Kornegay, E.T., Blodgett, D.J., Doerr, J.A. 1993.** Effectiveness of different types of clay for reducing the detrimental effects of aflatoxin-contaminated diets on performance and serum profiles of weanling pigs. *Journal of Animal Science* 71, 1226-1231.
- Schindler, A.F., Palmer, J.G., Eisenberg, W.V. 1967.** Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperatures. *Applied Microbiology* 15, 1006-1009.
- Schmidt-Heydt, M., Richter, W., Michulec, M., Buttinger, G., Geisen, R. 2008.** Comprehensive molecular system to study the presence, growth and ochratoxin A biosynthesis of *Penicillium verrucosum* in wheat. *Food Additives and Contaminants* 25, 989-996.
- Schmidt-Heydt, M., Rüfer, C., Raupp, F., Bruchmann, A., Perrone, G., Geisen, R. 2011.** Influence of light on food relevant fungi with emphasis on ochratoxin producing species. *International Journal of Food Microbiology* 145, 229-237.

## Références bibliographiques

- Schmidt-Heydt, M., Stoll, D., Schütz, P., Geisen, R. 2015.** Oxidative stress induces the biosynthesis of citrinin by *Penicillium verrucosum* at the expense of ochratoxin. *International Journal Food Microbiology* 192, 1-6.
- Schroeder, H.W., Hein, H.J.R. 1967.** Aflatoxins: production of the toxins *invitro* in relation to temperature. *Applied Microbiology* 15, 441-445.
- Schroeder, H.W., Hein, H.J. 1975.** A note on zearalenone in grain sorghum. *Cereal Chemistry journal* 52, 751-752.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J.C. Van Dijck, P.W. 2002.** On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59, 426-435.
- Scott, W. J. 1957.** Water relations of food spoilage microorganisms. *Advanced Food Research* 7, 83-127.
- Scott, P.M., Lawrence, G.A. 1994.** Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists international* 77, 541-545.
- Scott, P.M. 2012.** Recent research on fumonisins: A review. *Food Additives and Contaminants. Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 2, 242-248.
- Scudamore, K.A., Livesey, C.T. 1998.** Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage, a review. *Journal of Science of Food and Agriculture* 77, 1-7.
- Seetharaman K, Waniska RD, Rooney LW. 1996.** Physiological changes in sorghum antifungal proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 2435-2441.
- Selma, M. V., Martínez-Culebras, P. V., Elizaquivel, P., Aznar, R. 2009.** Simultaneous detection of the main black aspergilli responsible for ochratoxin A (OTA) contamination in grapes by multiplex real-time polymerase chain reaction. *Food Additives and Contaminants* 26, 180-188.
- Serrano, A.B., Font, G., Ruiz, M.J., Ferrer, E. 2012.** Co-occurrence and risk assessment of mycotoxin in food and diet from Mediterranean area. *Food Chemistry* 135, 423-429.
- Shapira, R., Paster, N., Eyal, O., Menasherov, M., Mett, A., Salomon, R., 1996.** Detection of aflatoxingenic molds in grains by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3270-3273.
- Sharma, R., Thakur, R.P., Senthilvel, S., Reddy, S.V., Rao, V.P., Varshny, R.K. 2011.** Identification and characterization of toxigenic *Fusaria* associated with sorghum grain mold complex in India. *Mycopathologia* 171, 223-230.

## Références bibliographiques

- Sherwood, R.F., Peberdy, J. F. 1974.** Production of the mycotoxin zearalenone, by *Fusarium graminearum* growing on stored grain. I Grain storage at reduced temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 25, 1081-1087.
- Shier, W.T., Sier, A.C., Xie, W., Mirocha, C.J. 2001.** Structure-activity relationships for human oestrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicon* 39, 1435-1438.
- Shotwell, O.L., Bennett, G.A., Goulden, M.L., Plattner, R.D., Hesseltine, C.W. 1980.** Survey for zearalenone, aflatoxin, and ochratoxin in U.S. grain sorghum from 1975 and 1976 crops. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists international* 63, 922-926.
- Sidhu, G.S. 2002.** Mycotoxin genetics and genes clusters. *European Journal of Plant Pathology* 108, 705-711.
- Simpson, D.R., Weston, G.E., Turner, J.A., Jennings, P., Nicholson, P. 2001.** Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *European Journal of Plant Pathology*. 107, 421-431.
- Sjögren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnürer, J., & kenne, L. 2003.** Antifungal 3-hydroxyl fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB14. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 7554-7557.
- Smith, T.K., Carson, M.S. 1984.** Effect of diet on T-2 toxicosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 177, 153-167.
- Smith, E.E., Phillips, T.D., Ellis, J.A., Harvey, R.B., Kubena, L.F., Thomson, J., Newton, G. 1994.** Dietary hydrated sodium calcium aluminosilicate reduction of aflatoxin M1 residue in dairy goat milk and effects on milk production and components. *Journal of Animal Science* 72, 677-682.
- Snijders, C.H.A. 1990.** *Fusarium* head blight and mycotoxin contamination of wheat, a review. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 96, 187-198.
- Sohn, H., Seo, J., Lee, Y. 1999.** Co-occurrence of *Fusarium* mycotoxins in mouldy and healthy corn from Korea. *Food Additives and Contaminants* 16, 153-158.
- Spadaro, D., Patharajan, S., Lorè, A., Garibaldi, A., Gullino, M.L. 2012.** Ochratoxigenic black species of aspergilli in grape fruits of northern Italy identified by an improved PCR-RFLP procedure. *Toxins* 4, 42-54.
- Steyn, P.S. 1980.** The biosynthesis of mycotoxins: a study of secondary metabolism, Academic Press, INC.
- Steyn, P.S. 1995.** Mycotoxins, general view, chemistry and structure.

## Références bibliographiques

- Steyn, P.S. 1998.** The biosynthesis of mycotoxins. *Revue de Médecine Vétérinaire* 149, 6: 469-478.
- Studer-Rohr, I., Schlatter, J., Dietrich, D. 2000.** Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Archives of Toxicology* 74, 499-510.
- Susca, A., Perrone, G., Cozzi, G., Stea, G., Logrieco, A.F., Mulè, G. 2013.** Multilocus sequence analysis of *Aspergillus* section *Nigri* in dried vine fruits of worldwide origin. *International Journal of Food Microbiology* 165, 163-168.

## T

- Tabuc, C. 2007.** Flore Fongique de Différents Substrats et Conditions Optimales de Production des Mycotoxines. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse et de l'Université de Bucarest.
- Téren, J., Varga, J., Hamari, Z., Rinyu, E., Kevei, F. 1996.** Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains, *Mycopathologia* 134, 171-176.
- Thompson, M., Ellison, R.S., Wood, Roger. 2002.** Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Applied Chemistry* 74 (5), 835-855.
- Tokusoglu, Ö., Bozoglu, F. 2010.** Citrinin risk in black and green table olives: simultaneous determination with Ochratoxin-A by optimized extraction and IAC-HPLC-FD. *Italian Journal of Food Science* 22, 284-291.
- Torres, M.R., Ramos, A.J., Soler, J., Sanchis, V., Marin, S. 2003.** SEM study of water activity and temperature effects on the initial growth of *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata* and *Fusarium verticillioides* on maize grain. *International journal of food microbiology* 81, 185-193.
- Troller, J.A. 1980.** Influence of water activity on microorganisms in foods. *Food Technology* 34 (5), 76.
- Tuite, J., Shaner, G., Everson, R.J. 1990.** Wheat scab in soft red winter wheat in Indiana in 1986 and its relation to some quality measurements. *Plant Diseases* 74, 959-962.

U

- Usleber E., Abramson D., Gessler R., Smith D.M., Clear R.M., Märtlbauer E. 1996.** Natural Contamination of Manitoba Barley by 3, 15-Diacetyldeoxynivalenol and Its Detection by Immunochromatography, *Applied and Environmental Microbiology* 62 (10), 3858-3860.

V

- Van der Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L. 1965.** Mycotoxins, Part II. The constitution of ochratoxins A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* wilh. *Journal of chemical Society* 5, 7083-7088.
- Van Egmond, H.P., Schothorst, R.C., Jonker, M.A. 2007.** Regulations relating to mycotoxins in food: Perspectives in a global and European context. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389, 147-157.
- Varga, J., Kocsube, S., Koncz, Z., Teren, J. 2006.** Mycobiota and ochratoxin A in raisins purchased in Hungary. *Acta Alimentaria* 35 (3), 289-294.
- Varga, J., Frisvad, J.C., Kocsubé, S., Brankovics, B., Szigeti, G., Samson, R.A. 2011.** New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology* 69, 1-17.
- Vendl, O., Berthiller, F., Crews, C., Krska, R. 2009.** Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, and their major masked metabolites in cerealbased food by LC-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 395, 1347-1354.
- Venturini, M. E., Blanco, D., Oria, R. 2002.** In vitro antifungal activity of several compounds against *Penicillium expansum*. *Journal of Food Protection*. 65, 934-939.
- Vindeløv, J., Arneborg, N. 2002.** Effects of temperature, water activity, and syrup film composition on the growth of *Wallemia sebi*: development and assessment of model predicting growth lags in syrup agar and crystalline sugar. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1652-1657.

W

- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics, Chap. PCR protocols. A guide to methods and applications. ed. Academic Press, San Diego, C.A., pp. 315-322.

## Références bibliographiques

- WHO. 1990.** Environmental health criteria 105 selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot, trichothecenes. *International Programme on Chemical Safety (IPCS) Geneva, World Health Organization.* 71-154.
- WHO-IARC. 1993.** Toxins derived from *Fusarium moniliforme*: Fumonisin B1 and B2 and fusarin C. Lyon France: IARC.
- Wicklow, D.T., Shotwell, O.L. 1983.** Intrafungal distribution of aflatoxin among conidia and selerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Canadian Journal of Microbiology* 29, 1-5.
- Wilson, S.C., Brasel, T.L., Carriker, C.G., Fortenberry, G.D., Fogle, M.R., Martin, J.M., Wu, C., Andriychuk, L.A., Karunasena, E., Straus, D.C. 2004.** An investigation into techniques for cleaning mould-contaminated home contents. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene* 1, 442-447.
- Winn, R.T., Lane, G.T. 1978.** Aflatoxin production on high moisture corn and sorghum with a limited incubation. *Journal Dairy Science* 61, 762-764.

## Y

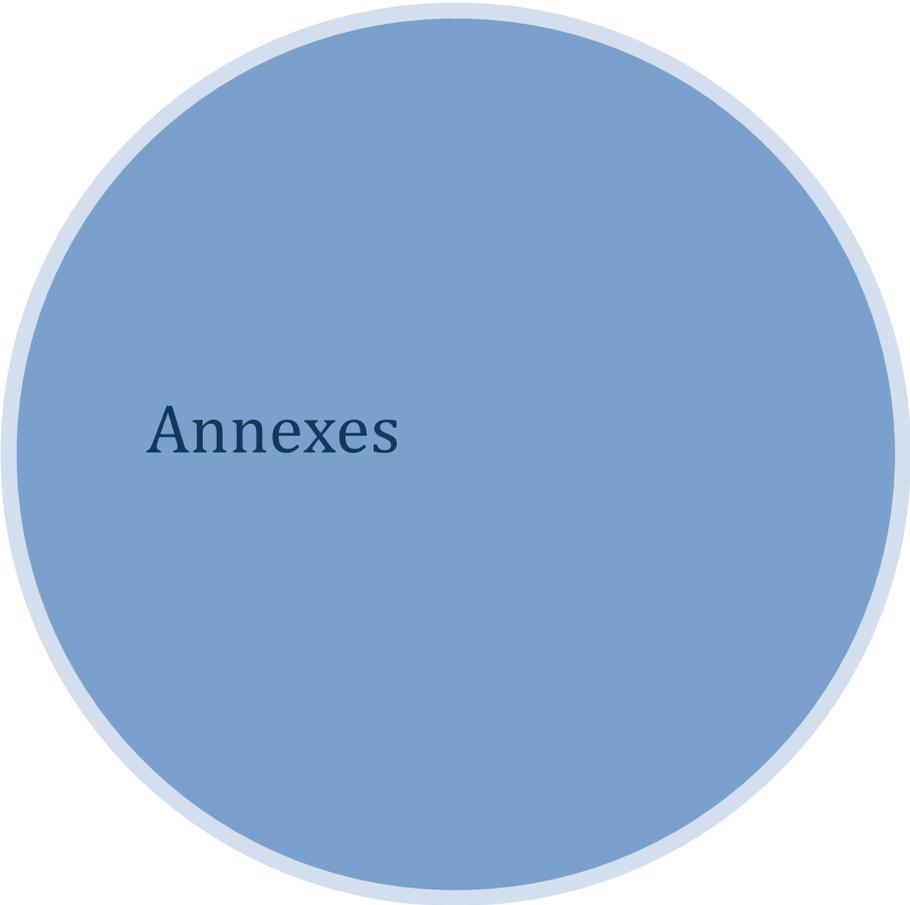
- Yiannikouris, A., Jouany, J.P. 2002.** Mycotins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research* 51, 81-99.
- Young, J.C., Trenholm, H.L., Friend, D.W., Prelusky, D.B. 1987.** Detoxification of deoxynivalenol with sodium bisulfite and evaluation of the effects when pure mycotoxin or contaminated corn was treated and given to pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35, 259-261.

## Z

- Zaied, C., Abid, S., Zorgui, L., Bouaziz, C., Chouchane, S., Jomaa, M., Bacha, H. 2009.** Natural occurrence of ochratoxin A in Tunisian cereals. *Food Control* 20, 218-222.
- Zaied, C., Zouaoui, N., Bacha, H., Abid, S. 2012a.** Natural occurrence of citrinin in Tunisian wheat grains. *Food Control* 28, 106-109.
- Zaied, C., Zouaoui, N., Bacha, H., Abid, S. 2012b.** Natural occurrence of zearalenone in Tunisian wheat grains. *Food Control* 25, 773-777.
- Zinedine, A. 2004.** Détermination des mycotoxines dans les aliments et étude de la réduction des aflatoxines par les bactéries lactiques isolées des ferments panaires traditionnels. Université Sidi Mohamed Ben Abdallah.

## Références bibliographiques

- Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debegnach, F., Angelini, S., De Santis, B., Faid, M., Benlemlih, M., Minardi, V., Miraglia, M. 2006.** Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *Food Control* 17, 868-874.
- Zummo, N. Scott, G.E. 1992.** Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on kernel infection and aflatoxin contamination in maize ears. *Plant Disease* 76, 771-773.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet, K. 1990.** Modelling of bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1875-1881.
-



Annexes

## **Annexe I : composition des milieux de culture**

### **1- Czapek Yeast Extract Agar (CYA)**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Czapek concentré	10 ml
Solution de métaux	1 ml
Extrait de levures, en poudre	5 g
Saccharose	30 g
Agar	15g
Eau distillée (qsp.)	1 litre

Stériliser à l'autoclave à 121°C pour 15 min, le pH final est 6,7.

### **Czapek concentré**

NaNO <sub>3</sub>	30 g
KCl	5 g
MgSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O	5 g
FeSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
Eau distillée (qsp.)	100 ml

Czapek concentré se maintiendra indéfiniment sans stérilisation. Le précipité de Fe(OH)<sub>3</sub> qui se forme avec le temps peut être re-suspendu en agitant avant emploi.

### **Solution de métaux**

CuSO <sub>4</sub> - 5H <sub>2</sub> O	0,5 g
ZnSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O	1 g
Eau, distillée	100 ml

Maintenir indéfiniment sans stérilisation.

### **2- Coconut agar medium (CAM)**

Saccharose	30 g
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O	0,01 g
HgCl <sub>2</sub>	0,135 g
Agar	18 g
Extrait de noix de coco	100 ml

Eau distillée 900 ml

Cent grammes de la noix de coco déchiquetée ont été homogénéisés pendant 5 minutes avec 300 ml d'eau distillée chaude. La solution est filtrée à l'aide du tissu. L'agar a été ajouté (18 g/l). Le mélange a été alors stérilisé à l'autoclave à 121°C/15 minutes. Le pH final est de 7,0.

### **3- DRBC (agar dichloran rose Bengal chlorenphénicol)**

Milieu sélectif pour l'identification des moisissures en général et inhiber la croissance des mucorales

Glucose	10g
Peptone bactériologique	1g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
MgSO <sub>4</sub> -7 H <sub>2</sub> O	0,5g
Agar	15g
Rose de Bengale	25 mg
Dichloran	2 mg
Chloramphénicol	100 mg
Eau distillée	1000 ml

Milieu de culture avec un pH final= 5,5-5,8 à 25°C. Les boîtes de pétri peuvent être conservées jusqu'à 2 mois à 2-8°C

### **4- PDA (potato dextrose agar)**

Milieu universel nutritif utilisé pour croissance, isolement et énumération des moisissures

Extrait de pomme de terre	200ml
Glucose	20g
Agar	12g
Eau distillée	800 ml

### **5- Vert de malachite**

Peptone	11,25g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,75g
MgSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O	0,375g
Vert de malachite	0,0019g

Agar	15g
Chloramphénicol	0,075 g
Eau distillée	750ml
Milieu sélectif pour <i>Fusarium</i>	

## Annexe II : préparation des solutions aqueuses du glycérol

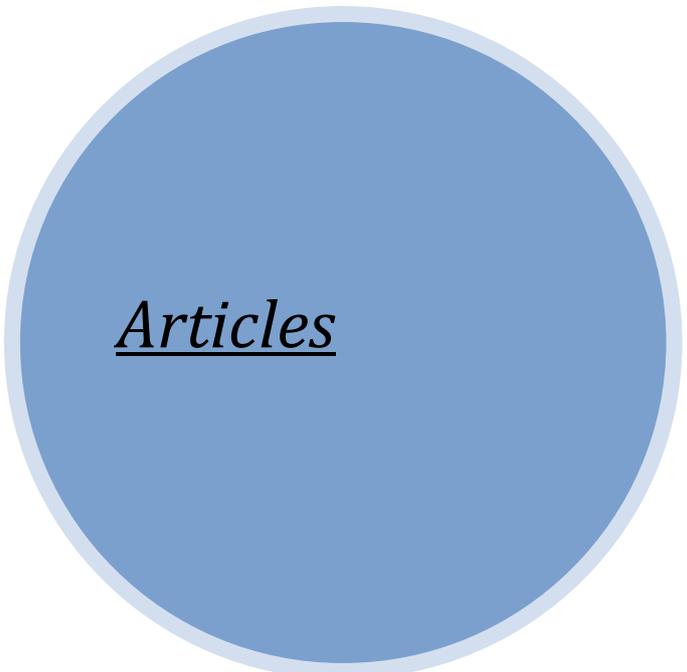
Relation entre humidité relative de l'air et la quantité du glycérol contenue dans une solution aqueuse

aw	g glycérol / 100 ml d'eau	aw	g glycérol / 100 ml d'eau
0,998	0,92	0,892	55,2
0,996	1,84	0,884	59,8
0,995	2,76	0,875	64,4
0,993	3,68	0,867	69
0,991	4,6	0,858	73,6
0,989	5,52	0,85	78,2
0,987	6,44	0,841	82,8
0,986	7,36	0,833	87,4
0,983	8,28	0,825	92
0,982	9,2	0,809	101,2
0,978	11,04	0,793	110,4
0,975	12,88	0,777	119,6
0,971	14,72	0,762	128,8
0,967	16,52	0,747	138
0,964	18,4	0,733	142,2
0,955	23	0,719	156,4
0,946	27,6	0,705	165,6
0,937	32,2	0,691	174,9
0,928	36,8	0,678	184,2
0,919	41,4	0,65	202,6
0,91	46	0,625	218,5
0,901	50,6	0,6	234,6

### **Annexe III : Extraction de l'AFB1 des colonies d'*Aspergillus flavus***

Volume du méthanol nécessaire pour l'extraction des aflatoxines à partir d'une colonie entière lors de l'étude la capacité de production des mycotoxines par *Aspergillus flavus* :

<b>Masse de l'agar en g</b>	<b>Volume du méthanol en ml</b>
0,5 - 2	5
2,1- 4,5	10
4,6 - 11	15
11,1 - 15	20
15,1 - 20	25



Articles



## Toxicogenic molds in Tunisian and Egyptian sorghum for human consumption



Amani Lahouar<sup>a, b, \*</sup>, Ana Crespo-Sempere<sup>b</sup>, Sonia Marín<sup>b</sup>, Salem Saïd<sup>a</sup>, Vicente Sanchis<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Biochemistry, Unity of Mycotoxicology, Faculty of Medicine of Sousse, University of Sousse, Mohamed Karoui, 4002, Sousse, Tunisia

<sup>b</sup> Food Technology Department, University of Lleida, XaRTA-UTPV, Agrotecnico Center, Rovira Roure 191, 25198, Lleida, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 June 2014

Received in revised form

26 June 2015

Accepted 1 July 2015

Available online xxx

#### Keywords:

Mycobiota

Sorghum

Fusarium

Aspergillus

Mycotoxin

### ABSTRACT

The objective of this study was to characterize the mycoflora of sorghum grains commercialized in the Tunisian retail market and to identify aflatoxins (AFs), ochratoxin A (OTA) and zearalenone (ZEA) producing species. Sixty four samples of sorghum (37 samples of Tunisian sorghum and 27 samples of Egyptian sorghum) were analyzed. Dilution plating (CFU, colony forming units) was used for fungal enumeration. The isolation of mycobiota was carried out by plating of grains on PDA and malachite green medium. *Aspergillus* section *Flavi* and section *Nigri* and *Fusarium* isolates were sub-cultured in CYA to test their ability to produce AFs, OTA and ZEA, respectively. The selected *Aspergillus* section *Flavi* and section *Nigri*, *Penicillium* and *Fusarium* isolates were subjected to specific PCR assays using published species-specific primers. The results revealed the dominance of *Fusarium* (95.3%), followed by *Aspergillus* (87.2%) and *Alternaria* (81.2%) species. The fungal counts ranged from 100 to  $1.3 \cdot 10^4$  CFU/g for Tunisian sorghum and from 100 to  $5.7 \cdot 10^3$  CFU/g for Egyptian sorghum. Among *Aspergillus* section *Flavi* isolates identified by molecular biology, *Aspergillus flavus* was the most dominant (90.1%) while *Aspergillus parasiticus* represent 9.9% only. About *Aspergillus* section *Nigri*, results showed the dominance of *Aspergillus niger* aggregate species, including *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis* and other species. Among *Fusarium* species, *Fusarium incarnatum* was the most dominant in both Tunisian and Egyptian sorghum. *Penicillium citrinum* was the dominant *Penicillium* species in the studied samples. More than 890 isolates belonging to the genus *Aspergillus* and *Fusarium* were tested in order to test their capacity to produce AFs, OTA and ZEA. The percentage of mycotoxin producing isolates in *Aspergillus* section *Flavi*, *A.* section *Nigri*, and *Fusarium* was 30.0%, 4.6% and 11.1%, respectively.

© 2015 Published by Elsevier Ltd.

### 1. Introduction

Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) is a cereal grain crop which originated in Africa, but is now mostly grown in Africa, Asia and America, primarily to ease food insecurity. According to ICRISAT/FAO (1996), as a global food source sorghum ranks the fifth after wheat, rice, corn, and barley and it is Africa's second most important crop in terms of tonnage. Sorghum is mostly grown in semiarid or subtropical regions due to its resistance to harsh weather conditions.

Sorghum grains are used as raw material for poultry, swine, and

bovine feeds but are also intended for humans as a staple food in some African and Asian countries (Veiga, 1986). In fact, a large proportion of people in Africa, especially in the rural communities live on a diet primarily composed of staple foods prepared from cereals, including sorghum, tubers and plantains (Oniang'o et al., 2003). Sorghum is replacing maize as a staple food commodity in many rural settlements (Bandyopadhyay et al., 2007). Thus sorghum production in Africa is increasing significantly with a corresponding decline of rice and wheat production (FAOSTAT, 2010). North African and Tunisian populations consume cereals such as wheat, barley, corn and sorghum and cereal products. Moreover, cereals contribute to approximately 12% output and Tunisian households spend around 25% of their food expenditures on cereals. Indeed, cereals commercialized in Tunisia are imported and little is known about molds and mycotoxins contamination. Tunisia and other North African countries border the Mediterranean Sea, where climate is characterized by high temperature and humidity

\* Corresponding author. The University of Sousse, The Faculty of Medicine, Laboratory of Biochemistry, Unity of Mycotoxicology, Tunisia.

E-mail addresses: [amanilahouar@yahoo.fr](mailto:amanilahouar@yahoo.fr) (A. Lahouar), [ana\\_cre@hotmail.com](mailto:ana_cre@hotmail.com) (A. Crespo-Sempere), [smarin@tecal.udl.cat](mailto:smarin@tecal.udl.cat) (S. Marín), [salem.saïd@fmso.rnu.tn](mailto:salem.saïd@fmso.rnu.tn) (S. Saïd), [vsanchis@tecal.udl.cat](mailto:vsanchis@tecal.udl.cat) (V. Sanchis).

levels that may stimulate toxigenic mold growth and their secondary metabolite production.

Conversely, the overall world loss of foodstuff in the form of grains is considered to be 5% of the total production (FAO/WHO/UNEP, 1977). One of the main agents that cause these significant losses in cereals is fungi. In addition, these fungi are capable of producing not only losses in the organoleptic quality of the grain but accumulating mycotoxins in cereals that can cause health problems to humans and animals (Chu and Li, 1994; Thiel et al., 1992). In Brazil, losses of 10–25% have estimated to occur throughout the trading process, partly due to contamination with toxigenic fungi and mycotoxins (Pedrosa and Dezen, 1991).

*Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Phoma*, *Aspergillus*, and *Penicillium* are genera associated with the contamination of sorghum grains (Pitt et al., 1994; Gonzalez et al., 1997; Da Silva et al., 2000; Alves dos Reis et al., 2010). These fungi have different requirements of humidity and temperature. Thus depending on these factors fungi are able to contaminate grains from harvest through transport and storage. In addition, if the conditions in the grain are favorable they can grow and produce mycotoxins. Therefore prevention of fungal growth effectively conduces to prevention of mycotoxin accumulation (Barros et al., 2008). A number of fungal species associated with sorghum, belonging mainly to the genera *Fusarium* (*Fusarium verticillioides*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium equiseti*), *Alternaria* (*Alternaria alternata*), *Aspergillus* (*Aspergillus flavus*), and *Penicillium* (*Penicillium funiculosum*) have been reported to produce mycotoxins and contaminate sorghum (Alves dos Reis et al., 2010; Da Silva et al., 2006; Isakeit et al., 2008).

The growing importance of sorghum as food and feed in a high number of countries and the possibility that this grain is contaminated with mycotoxin shasled the Codex Alimentarius Commission to ask for studies to obtain more data on the occurrence of mycotoxins in sorghum. The main objective is to try to minimize the problem of the mycotoxins in sorghum around the world (Codex Alimentarius Commission, 2012).

In view of these considerations, the aim of the present study was to assess the contamination level in sorghum samples intended for human consumption from the retail market of Tunisia. For this purpose the mycobiota present in the samples was first analyzed and subsequently the ability of a number of fungal isolates belonging to *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* to produce AFs, OTA and ZEN was tested under optimal conditions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples

In 2011–2012, a total of 64 sorghum samples were collected in the retail market of Sousse, and Monastir, two regions of the center of Tunisia characterized by coastal and humid climate. Thirty seven (37) samples of sorghum were Tunisian products while twenty seven (27) were imported from Egypt. The samples (each about 500 g) were kept in food polyethylene bags at 4 °C.

### 2.2. Mycobiota determination

The study of the mycobiota present in the samples under observation was carried out by quantitative enumeration (fungal counts) and determination of internal fungi.

#### 2.2.1. Fungal counts

The quantitative enumeration of fungal propagules was done on solid media using the surface-spread method. Serial dilutions in peptone saline water were made and 100 µl aliquots were

inoculated onto plates of potato dextrose agar (PDA) supplemented with 100 ppm of chloramphenicol and plates of dichloran rose Bengal chloramphenicol (DRBC) agar (5.0 g of peptone, 10 g of dextrose, 1.0 g of monopotassium phosphate, 0.5 g of magnesium sulfate, 0.02 g of 2-6-dichloro-4-nitro-aniline, 0.025 g of rose Bengal, 0.10 g of chloramphenicol and 15 g of agar in 1 L of distilled water). Plates were incubated at 25 °C for 7 days. Dilution plates with 10–100 CFU were used for enumeration and the results were expressed as CFU per gram of sample. However, in samples with a low level of fungal contamination, plates with less than 10 CFU/CFU at the lowest tested dilution ( $10^{-1}$ ) were recorded. The molds present on the plates were identified to genus level using the identification keys by Pitt and Hocking (1997). *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *Fusarium* spp. were isolates were kept in potato dextrose agar plates.

#### 2.2.2. Internal mycobiota

For isolation of the internal mycobiota, a subsample of 200 kernels of each sample was surface disinfected in a 2% aqueous solution of sodium hypochlorite for 2 min, and rinsed twice with sterile distilled water. The kernels were aseptically plated in dichloran rose Bengal chloramphenicol (DRBC) agar (5 kernels/plate). Plates were incubated at 25 °C for 7 days. After incubation, they were examined for fungal growth, and the molds present on the kernels were identified to genus level using the methods of Pitt and Hocking (1997). Moreover, malachite green agar (11.25 g of peptone, 0.75 g of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.375 g of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0019 g of green malachite, 0.075 g of chloramphenicol, and 15 g of agar in 750 mL of distilled water) was used for plating in order to detect *Fusarium* species. *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *Fusarium* spp. were transferred to potato dextrose agar plates. Results in DRBC agar were reported as percentage of infected kernels. The isolation frequency (Fq) and the relative density (Rd) of genera and species were calculated according to Marasas et al. (1988) as follows:

$$\text{frequency (\%)} = \frac{\text{Number of samples of occurrence of a genus}}{\text{Total number of samples}} \times 100$$

$$\text{relative density (\%)} = \frac{\text{Number of isolates of a genus or species}}{\text{Total number of fungi or genus isolates}} \times 100$$

#### 2.2.3. Molecular characterization of the isolates

2.2.3.1. A- DNA extraction. Selected fungal strains were cultured in 500 µl of Malt Extract broth (malt extract: 20 g, peptone: 1 g, glucose: 20 g, distilled water: 1000 ml). After 2 days of growth at 28 °C, mycelium was centrifuged (10 min–17,500 × g) and DNA was extracted with 300 µl of DNA extraction buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% w/v SDS). The mycelium suspension was lysed by vortexing with five 2.8 mm stainless steel beads (Precellys, Bertin Technologies, France) during 10 min. After centrifugation at 17,500 × g for 10 min, 150 µl of 3 M sodium acetate were added to the supernatant. Then, supernatant was stored at –20 °C for 10 min and centrifuged (10 min–17,500 × g). The DNA-containing supernatant was transferred to a new tube and nucleic acids were precipitated by adding 1 volume of isopropyl alcohol. After 5 min of incubation at room temperature, the DNA suspension was centrifuged and the DNA pellet was washed with 70% ethanol to remove residual salts. Finally, the DNA was

resuspended in 50  $\mu$ l of TE buffer. The quality and concentration of DNA were determined in a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington USA).

**2.2.3.2. B- PCR procedure.** Identification of *Aspergillus* section *Flavi* and *Nigri* species was done by molecular characterization using specific primers, whereas identification of *Fusarium* isolates was conducted by partial sequencing of the Transcription Elongation Factor 1 alpha (TEF-1 $\alpha$ ) gene and the Beta Tubulin ( $\beta$ -tubulin) gene using the primer pairs BT2A/BT2B and EF-1/EF-2, respectively. Additionally, the identification of other potential mycotoxin producer isolates was carried out by partial sequencing of the ITS region and the  $\beta$ -tubulin gene (Table 1).

To identify *Aspergillus* section *Nigri*, a multiplex PCR with the primer pairs for *Aspergillus niger/A. awamori*, *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus tubingensis* detailed in Table 1, was conducted. PCR reactions were performed in a final volume of 10  $\mu$ l containing 1  $\mu$ l of buffer 10x, 0.25  $\mu$ l of dNTPs (10 mM), 0.5  $\mu$ l of each primer (10 mM), 0.1  $\mu$ l of DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l) (DFS-Taq DNA polymerase, BIORON, Germany), 4.65  $\mu$ l of water and 1  $\mu$ l of DNA sample (10 ng/ $\mu$ l).

The identification of *A. flavus* and *Aspergillus parasiticus* was carried out using AfAflT-F, AfAflT-R. Two DNA extracts of *A. flavus* CECT 2695 and *A. parasiticus* CECT 2681 were used as reference. PCR reactions were performed in a final volume of 10  $\mu$ l, containing 1  $\mu$ l of buffer 10x, 0.25  $\mu$ l of dNTPs (10 mM), 0.5  $\mu$ l of each primer (10  $\mu$ M), 0.1  $\mu$ l of DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l) (DFS-Taq DNA polymerase, BIORON, Germany), 5.65  $\mu$ l of water and 1  $\mu$ l of DNA sample (10 ng/ $\mu$ l).

For *Fusarium* identification, partial sequencing of the TEF-1 $\alpha$  and  $\beta$ -tubulin genes was conducted in PCR reactions in a final volume of 50  $\mu$ l with the same cocktail proportions. PCR products were cleaned with the Ultra Clean PCR Cleanup DNA Purification kit (MOBIO, USA). The PCR purified products were directly sequenced by the company Macrogen (Korea). Sequence similarity searches were performed with BLAST (basic local alignment search tool) against public databases.

### 2.3. Mycotoxin-producing ability

#### 2.3.1. OTA-producing ability

The isolates belonging to recognized OTA-producing species of *Aspergillus* and *Penicillium* genus were evaluated using a previously described high performance liquid chromatography (HPLC) screening method (Bragulat et al., 2001). Briefly, the isolates were grown on plates containing Czapek yeast extract agar (CYA) (Pitt and Hocking, 1997) and incubated at 25  $^{\circ}$ C for 7 days. From each culture, three agar plugs were removed from different points of the colony and extracted with 1 mL of methanol. The obtained extracts were filtered and analyzed by HPLC. OTA was quantified on the basis of the HPLC fluorometric response compared with that of the

standard OTA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). The detection limit for OTA is 0.21  $\mu$ g/kg (Bragulat et al., 2001).

#### 2.3.2. Aflatoxin and zearalenone -producing ability

The isolates belonging to *Aspergillus* section *Flavi* and *Fusarium* spp. were evaluated for aflatoxin and zearalenone-producing ability, respectively. The modified Bragulat method described previously for ochratoxin A was used for both mycotoxins. The only difference was that for aflatoxin-producing ability the coconut agar medium (CAM) (Lin and Dianese, 1976) was also employed. The obtained extracts were filtered and analyzed by HPLC. The mycotoxins were quantified on the basis of the HPLC fluorometric response compared with that of the standards of aflatoxins and zearalenone (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). An ultraviolet (UV) light photochemical derivatizer (LC Tech, Dorfen, Germany), set at 254 nm, and located between the column and detector, was used for aflatoxins quantification. The detection limit for aflatoxins was 0.60  $\mu$ g/kg and for zearalenone 0.017  $\mu$ g/kg.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Mycobiota determination

Fungal enumeration results associated with sorghum grain purchased at the retail market in Tunisia during 2011 and 2012 are presented in Table 2. The studied samples were from Tunisia and Egypt. The mean fungal count value of the total samples was  $2.5 \cdot 10^3$  CFU/g ( $100\text{--}1.3 \cdot 10^4$  CFU/g for Tunisian sorghum and  $100\text{--}5.7 \cdot 10^3$  CFU/g for Egyptian sorghum). We did not find significant differences between both groups of samples. The fungal levels were lower than those obtained by Lefyedi et al. (2005) with counts of  $2.7 \cdot 10^4$  CFU/g. The commonly isolated fungi were a species of *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Alternaria* and *Penicillium*. *Aspergillus* species belonging to the sections *Flavi* and *Nigri* predominated.

The internal mycobiota associated with sorghum samples is shown in Table 3. The presence of fungi was observed in all of the sorghum samples analyzed (37 from Tunisia and 27 from Egypt).

**Table 2**

Mean values of total mold counts, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, and *Rhizopus* counts in sorghum samples purchased at Tunisian retail market during 2011 and 2012.

Mean value	Sorghum samples counts (CFU/g)		
	Tunisia	Egypt	Total samples
Total mold counts	$2.8 \cdot 10^3$	$2.0 \cdot 10^3$	$2.5 \cdot 10^3$
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	$1.6 \cdot 10^2$	$3.2 \cdot 10^2$	$2.8 \cdot 10^2$
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	$4.8 \cdot 10^2$	$4.2 \cdot 10^2$	$4.4 \cdot 10^2$
<i>Penicillium</i>	2	$1.0 \cdot 10^2$	$0.6 \cdot 10^2$
<i>Fusarium</i>	$1.1 \cdot 10^2$	$4.4 \cdot 10^2$	$2.2 \cdot 10^2$
<i>Rhizopus</i>	$0.2 \cdot 10^2$	$0.8 \cdot 10^2$	$0.5 \cdot 10^2$

**Table 1**

Primers used for PCR identification.

Fungal species	Primer pairs	Forward	Reverse	T $^{\circ}$ annealing	References
<i>A. niger</i>	NIG1, NIG2	5'-GATTTCGACAGCATTT(CT/TC)CAGAA-3'	5'-AAAGTCAATCAATCCAGCCC-3'	60 $^{\circ}$ C	Susca et al., 2007
<i>A. carbonarius</i>	AckS10R, AcKS10L	5'-CCCTGATCCTCGTATGATAGCG-3'	5'-CCGGCCTTAGATTCTCTCACC-3'	60 $^{\circ}$ C	Selma et al., 2008
<i>A. tubingensis</i>	TUB1, TUB2	5'-TCGACAGCTATTTCCCTT-3'	5'-TAGCATGTCATATCACGGGCAT-3'	60 $^{\circ}$ C	Susca et al., 2007
<i>A. flavus</i>	AfAflT-F, AfAflT-R	5'-CGCGCGAGATACTTCTTACT-3'	5'-GAGCCCACTTCGAAAATACC-3'	70 $^{\circ}$ C	Godet and Munaut, 2010
<i>A. parasiticus</i>					
<i>Fusarium</i> spp.	BT2A, BT2B	5'-GGTAACCAATCGGTGCTGCTTC-3'	5'-ACCCTCACTGTAGTGACCCTGGC-3'	60 $^{\circ}$ C	Glass and Donaldson, 1995
	ef1, ef2	5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3'	5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3'	53 $^{\circ}$ C	O'Donnell et al., 1998
Other unidentified isolates	ITS1, ITS4	5'-TTTCCGTAGGTGAACCTGC-3'	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	56 $^{\circ}$ C	

**Table 3**  
Internal mycobiota of sorghum purchased at Tunisian retail market during 2011 and 2012 (mean and mean standard error).

Fungus	Incidence (percentage of infected samples) <sup>1</sup>			Relative density (percentage of isolated genus) <sup>2</sup>			Average percent of infected grains <sup>3</sup>		
	Tunisia	Egypt	Total	Tunisia	Egypt	Total	Tunisia	Egypt	Total
<i>Aspergillus</i>	86.11 ± 2.61	89.28 ± 0.57	87.5 ± 1.49	12.84 ± 1.71	11.45 ± 1.72	12.22 ± 1.21	6.15 ± 1.74	2.96 ± 0.38	4.73 ± 0.99
Section <i>Flavi</i>	58.33 ± 1.82	53.57 ± 0.23	56.25 ± 1.06	5.59 ± 0.93	4.65 ± 0.69	5.2 ± 0.61	3.4 ± 1.22	1.33 ± 0.16	2.54 ± 0.71
Section <i>Nigri</i>	66.66 ± 1.36	67.86 ± 0.33	67.19 ± 0.79	7.82 ± 0.96	6.01 ± 0.72	7.02 ± 0.63	3.92 ± 0.91	1.82 ± 0.22	2.99 ± 0.53
Section <i>Circumdati</i>	27.77 ± 0.05	39.28 ± 0.09	32.81 ± 0.05	2.30 ± 0.33	5.83 ± 1.75	4.1 ± 0.865	0.73 ± 0.03	0.91 ± 0.06	0.82 ± 0.03
Section <i>Terri</i>	11.11 ± 0.13	25 ± 0.09	17.18 ± 0.08	9.48 ± 1.57	3.69 ± 0.34	5.8 ± 0.76	1.33 ± 0.09	0.86 ± 0.06	1.03 ± 0.05
<i>Eurotium</i>	30.55 ± 0.89	60.71 ± 0.39	43.75 ± 0.46	7.04 ± 1.82	5.43 ± 1.14	6.07 ± 1.02	2.30 ± 0.59	1.57 ± 0.26	1.86 ± 0.31
<i>Penicillium</i>	66.66 ± 0.28	60.71 ± 0.25	64.06 ± 0.19	4.09 ± 0.49	5.41 ± 0.68	4.64 ± 0.41	1.61 ± 0.19	1.57 ± 0.17	1.59 ± 0.13
<i>Fusarium</i>	97.22 ± 1.67	92.86 ± 1.71	95.31 ± 1.21	24.35 ± 2.81	22.74 ± 2.08	23.66 ± 1.82	9.24 ± 1.11	7.66 ± 1.14	8.57 ± 0.80
<i>Alternaria</i>	83.33 ± 3.36	78.57 ± 0.64	81.25 ± 2.36	23.71 ± 3.53	8.01 ± 1.01	17.30 ± 2.28	10.51 ± 2.24	2.53 ± 0.43	7.32 ± 1.39
<i>Curvularia</i>	72.22 ± 0.93	85.71 ± 1.06	78.12 ± 0.71	91 ± 1.45	15.93 ± 1.94	12.38 ± 1.25	3.15 ± 0.62	4.83 ± 0.71	3.96 ± 0.47
<i>Cladosporium</i>	27.77 ± 0.22	39.28 ± 0.19	32.81 ± 0.14	3.94 ± 0.44	2.98 ± 0.31	3.44 ± 0.27	1.2 ± 0.14	1.03 ± 0.13	1.11 ± 0.09
<i>Drechslera</i>	69.44 ± 0.44	89.28 ± 0.72	78.12 ± 0.41	6.86 ± 1.02	9.86 ± 1.16	8.36 ± 0.78	2.58 ± 0.29	3.12 ± 0.48	2.85 ± 0.27
<i>Rhizopus</i>	11.11 ± 0.00	10.71 ± 0.00	10.94 ± 0.00	1.36 ± 0.14	1.98 ± 0.14	1.62 ± 0.11	0.66 ± 0.00	0.66 ± 0.00	0.66 ± 0.00
Other genera	88.89 ± 2.26	100% ± 1.32	93.75 ± 1.37	19.59 ± 2.37	22.74 ± 2.32	21.06 ± 1.66	8.54 ± 1.51	6.93 ± 0.88	7.79 ± 0.91

<sup>1</sup>Frequency (%) = Number of samples of occurrence of a genus × 100/total number of samples.

<sup>2</sup>Relative density (%) = number of isolated of a genus × 100/total number of isolated fungi.

<sup>3</sup>Average percent (%) = Number of infected kernels by a mold in each sample × 100/total number of kernels.

The main genera isolated, listed in decreasing order of frequency were *Fusarium* (95.3%), *Aspergillus* (87.5%), *Alternaria* (81.2%), *Curvularia* (78.1%), *Drechslera* (78.1%), *Penicillium* (64.0%), *Eurotium* (43.7%), and *Cladosporium* (32.8%). Regarding the relative density, the three most important genera were *Fusarium* (23.6%), *Alternaria* (17.3%) and *Aspergillus* (12.2%). The predominance of these filamentous fungi found in this work agrees with other studies of sorghum mycobiota in Brazil (Da Silva et al., 2000), Thailand (Pitt et al., 1994), and India (Sharma et al., 2011). The high presence of storage molds like *Aspergillus*, *Penicillium* and *Eurotium* was due to the fact that the samples were not freshly harvested.

Regarding genus *Aspergillus* the two main sections are *Nigri* and *Flavi* with a relative density of 7.0% and 5.2%. The low frequency of isolation of *A. flavus* and *A. parasiticus* from sorghum grains is in agreement with the study of Ratnavathi and Sashidhar (2003) and the study of Alves dos Reis et al. (2010). According to those authors, the physical characteristics and biochemical composition of the grains make sorghum less susceptible than other cereals to infection with *Aspergillus*. However, Da Silva et al. (2000) showed the presence of *Aspergillus* genus in Brazilian sorghum with high frequency (42.7%), and *A. flavus* was the prevalent specie, although they did not surface-disinfect the grains before plating.

In our samples, *A. flavus* was, as well, the prevalent species from *Aspergillus* section *Flavi* in Tunisian and Egyptian sorghum grains (Table 4). We obtained 91 isolates from section *Flavi*, and 82 isolates (90.11%) were identified as *A. flavus*. Among 347 isolates of *Aspergillus* section *Nigri*, *A. niger* aggregate other than *A. niger/A. awamori* and *A. tubingensis* were the most dominant (Table 5). *A. niger* clade includes 10 biserial species, e.g. *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus acidus*, *Aspergillus neoniger*. However, only *A. niger* is known to be able to produce OTA (Varga et al., 2011). Other *A. niger* aggregate species in Egyptian sorghum were more common than *A. niger* and *A. tubingensis*, while *A. niger* was the most dominant in Tunisian sorghum. These species were dominant in sorghum from

Argentina, Thailand and Brazil (Alves dos Reis et al., 2010; Gonzalez et al., 1997; Pitt et al., 1994). *A. carbonarius* was not detected in the present study; however, this species showed a higher distribution in Indian sorghum samples (Priyanka et al., 2014).

Conversely, *Aspergillus* sections *Circumdati* and *Terrei* have been detected in sorghum seeds, being *Aspergillus flocculosus* and *Aspergillus terreus* the species isolated in this study, respectively. *Eurotium repens* and *Eurotium chevalieri* were the most predominant *Eurotium* species in the analyzed sorghum samples. Other species identified were *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus sidowii* and *Emericella nidulans*.

Contamination of sorghum grains with the genus *Penicillium* was very low. Among the 30 *Penicillium* spp. isolates, isolated as internal mycobiota from Tunisian and Egyptian sorghum grain, the predominant species recorded was *P. Citrinum* (20 isolates). Other species found in the study were *P. Funiculosum* (6 isolates) and *P. Purpurogenum* (4 isolates). Similar results were obtained by Gonzalez et al. (1997) in Argentinian sorghum. None of the *Penicillium* species found has been cited as OTA producer species.

Isolates of *Fusarium* were the most prevalent components of the internal seedborne mycobiota of sorghum grains for the two groups of samples. Four hundred and fifty one isolates of *Fusarium* were inoculated on potato dextrose agar (PDA) plates. Morphological/cultural characters of these isolates were studied on PDA. From these, 59 isolates from different locations representing different morphological/cultural characters isolates were selected for full identification.

The identification of the species corresponding to the 59 *Fusarium* isolates was carried out using Blast n-searches in the Gen bank by determination of level of identifying with known *Fusarium* sequences. Twelve species of *Fusarium*- *Fusarium incarnatum* (*F. equiseti* complex) (37 isolates), *F. verticillioides* (*Gibberella moniliformis*) (4 isolates), *Fusarium thapsinum* (2 isolates), *Fusarium proliferatum* (2 isolates), *Fusarium pseudonygamae* (2 isolates),

**Table 4**  
Identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates.

Species	Tunisia		Egypt		Total	
	Isolates number	Incidence (%)	Isolates number	Incidence (%)	Isolates number	Incidence (%)
<i>Aspergillus flavus</i>	51	91.07	31	88.57	82	90.11
<i>Aspergillus parasiticus</i>	5	8.93	4	11.43	9	9.89
Isolates number	56		35		91	

**Table 5**  
Identification of *Aspergillus* section *Nigri* isolates.

Species <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	Tunisia		Egypt		Total	
	Isolates number	Incidence (%)	Isolates number	Incidence (%)	Isolates number	Incidence (%)
<i>Aspergillus niger</i>	89	38.2	30	26.32	119	34.3
<i>Aspergillus tubingensis</i>	57	24.46	23	20.18	80	23.05
Other <i>Aspergillus niger</i> aggregate	87	37.34	61	53.51	148	42.65
Isolates number	233		114		347	

*Fusarium nelsonii* (3 isolates), *Fusarium venenatum* (2 isolates), *Fusarium pseudograminearum* (1 isolate), *Fusarium brachygibbosum* (1 isolate), *Fusarium acuminatum* (1 isolate), *Fusarium lacertarum* (1 isolate), *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*) (2 isolates) and *Gibberella xylarioides* (1 isolate) were identified based on sequence similarity. *F. incarnatum* was identified as a predominant (37 of the 59 isolates tested) species in *Fusarium* sorghum mold complex. This species has been associated with sorghum seeds in India (Sharma et al., 2011; Divakara et al., 2013) and Argentina (Gonzalez et al., 1997). The species of the *Liseola* section (*F. verticillioides*, *F. thapsinum*, *F. proliferatum* and *F. pseudonygamai*) with 10 isolates are also important. *Fusarium* species included in the section *Liseola* have been reported to be associated with sorghum grain mold complex in different countries (Divakara et al., 2013). In fact, *F. thapsinum* is the predominant species in India (Sharma et al., 2011) and Uganda (Prom et al., 2011), and has been reported to be common in sorghum grain (Leslie et al., 2005). In addition, species of this section have the capacity to produce fumonisins, moniliformin, fusaric acid, beauvericin (Leslie et al., 2005). The incidence of *Fusarium* species from *Liseola* section should be responsible of the fumonisin contamination in sorghum from different countries (Scott, 2012).

*Alternaria* spp. also showed high isolation frequency in the studied samples and *Aspergillus tenuis* was the main specie isolated in both groups of sorghum samples (58.28%).

Other species identified were *Curvularia lunata*, *Curvularia pallescens*, *Phoma sorghina*, *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium fulvum* (syn. *Passolorafulva*), *Chaetomium funicola*, *Bipolaris* spp., *Ulocladium* spp., *Epicoccum nigrum*, *Trichothecium roseum*, *Nigrospora oryzae*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor* spp.. These species have been found by other researchers in sorghum samples from other countries like Argentina, Bangladesh, Brazil, South Africa and Thailand (Alves dos Reis et al., 2010; Gonzalez et al., 1997; Isakeit et al., 2008; Lefyedi et al., 2005; Pitt et al., 1994).

Correct species identification is necessary for evaluating the possible risk of mycotoxins contamination as not all the species within a genus are able to produce mycotoxins and the production level varies among mycotoxin-producing species. Over the past decades, the classical fungal taxonomy has shifted to molecular identification because it is very difficult to establish systems of taxonomy based on phenotypic characteristics (Begerow et al., 2010). Therefore, the importance of molecular methods to differentiate taxa for important mycotoxin-producing fungi such as *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *Fusarium* spp. is emphasized. The sequences most commonly used to distinguish among species are portions of genomic sequences encoding nuclear ribosomal genes which include the large subunit (26S or 28S) and the small subunit (18S) separated by the Internal Transcribed Space (ITS), the  $\beta$ -tubulin gene and the transcription elongation factor 1 alpha gene (Glass and Donaldson, 1995; O'Donnell, 1993; White et al., 1990). Not all primers used to amplify the regions mentioned above work equally well for all species, so, in each case we have to use the most widely accepted marker for differentiation among representatives of each genus or section.

Nevertheless, little work has been done to characterize fungal

diversity in sorghum by molecular identification. Da Silva et al. (2006) studied the genetic variability of 21 *Fusarium verticillioides* strains isolated from sorghum cultivated in the State of São Paulo, Brazil, using SPAR (Single Primer Amplification Reaction) markers while Divakara et al. (2013) identified and characterized 27 *Fusarium* spp., isolated from 58 sorghum seed samples collected across India, sequencing the transcription elongation factor 1 alpha gene and analyzing the Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphisms. Additionally, Priyanka et al. (2014) studied the diverse distribution of 200 *Aspergillus* strains from a total of 320 samples of maize, paddy, sorghum and groundnut by species-specific PCR assays. However, to our knowledge, there are no previous publications about the mycobiota of African sorghum in which molecular methods are used to differentiate taxa. In this study, not only *Fusarium* and *Aspergillus* isolates but also *Penicillium* and other interesting isolates have been studied by molecular methods. This, together with the high number of isolates identified (more than 600 isolates) is crucially important to clarify the occurrence of mycotoxin-producing strains in sorghum samples from Africa.

### 3.2. Mycotoxin-producing ability

In *Aspergillus* section *Flavi*, 33 over 91 tested isolates (36.26%) were able to produce aflatoxins. All positive isolates belonged to *A. flavus* species (40.24%) and produced detectable levels of aflatoxins B1 and B2 at concentrations ranging from 0.60 to 15.00  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Similar studies were carried out in sorghum from Brazil and India. In Brazilian sorghum, Da Silva et al. (2000) found 64.4% aflatoxigenic *A. flavus* strains, aflatoxin B1 + B2 ranging from 12.0 to 3282.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . In Indian sorghum samples, Divakara et al. (2013) found 83.8% aflatoxigenic *A. flavus* strains.

Regarding *Aspergillus* section *Nigri*, we tested three hundred forty-seven (347) isolates, the percentage of OTA positive isolates was very low (4.61%). This low percentage is related to the absence of detecting isolates of *A. carbonarius* which is the species in the *Nigri* section with the highest percentage of OTA producing isolates. The 16 ochratoxigenic isolates produced OTA at concentrations ranging from 0.21 to 1.50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

One isolate of *A. flocculosus* (*Aspergillus* section *Circumdati*) showed the highest capacity to produce OTA. The isolate produced 492.33  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . This species has been reported to produce large amounts of OTA by Frisvad et al. (2004), but had not been isolated from sorghum before.

Finally, we found 50 isolates of *Fusarium* with capacity to produce zearalenone (11.09%). These isolates produced detectable levels of this mycotoxin at concentrations ranging from 0.017 to 4.61  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . These low values could be explained by the predominance of species of *F. equiseti* complex and no detection of species such as *F. graminearum* and *Fusarium culmorum* that are the higher zearalenone producers.

This study is the first report about the incidence and mycotoxigenic capacity of the species belonging to the three main toxigenic genus (*Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*) with capacity to contaminate sorghum destined for human consumption.

#### 4. Conclusion

The results revealed the dominance of *Fusarium* species followed by *Aspergillus* species and *Alternaria* in the studied samples. No differences in mycobiota were observed between samples from Tunisia and Egypt. The results presented in the study show the need for routine monitoring of sorghum during both harvest and storage in order to prevent from fungal growth and mycotoxin accumulation in the sorghum grains, as well as the need for routine analysis of sorghum batches for mycotoxins prior further processing for food production.

#### Acknowledgments

We thank Montse Prim for her encouragement and technical assistance. The authors are grateful to the European Union (MYCORED KBBE-2007-2-5-05 project) and Tunisian government for the financial support.

#### References

- Alves dos Reis, T., Zorzete, P., Pozzi, C.R., da Silva, V.N., Ortega, E., Correa, B., 2010. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian sorghum from sowing to harvest. *J. Sci. Food Agric.* 90, 1445–1451.
- Bandyopadhyay, R., Kumar, M., Leslie, J.F., 2007. Relative severity of aflatoxins contamination of cereal crops in West Africa. *Food Addit. Contam.* 24, 1109–1114.
- Barros, G.G., Garcia, D., Oviedo, S., Ramirez, M.L., Torres, A., Chulze, S., 2008. Deoxynivalenol and nivalenol analysis in soybean and soyflour. *World Mycotoxin J.* 2, 263–266.
- Begerow, D., Nilsson, H., Unterseher, M., Maier, W., 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 99–108.
- Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Cabañes, F.J., 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *Int. J. Food Microbiol.* 71, 139–144.
- Chu, F.S., Li, G.Y., 1994. Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 847–852.
- Codex Alimentarius Commission, 2012. Discussion paper on mycotoxins in sorghum. In: Joint FAO/WHO Food Standards Programme CODEX Committee on Contaminants in Foods' 6th Session held in The Hague, The Netherlands on 26–30 March 2012.
- Da Silva, J.B., Pozzi, C.R., Mallozzi, M.A.B., Ortega, E.M., Correa, B., 2000. Mycoflora and occurrence of aflatoxin B1 and fumonisin B1 during storage of Brazilian sorghum. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4352–4356.
- Da Silva, V.N., Fernandes, F.M.C., Cortez, A., Ribeiro, D.H.B., de Almeida, A.P., Hassegawa, R.H., Corrêa, B., 2006. Characterization and genetic variability of *Fusarium verticillioides* strains isolated from corn and sorghum in Brazil based on fumonisins production, microsatellites, mating type locus, and mating crosses. *Can. J. Microbiol.* 52, 798–804.
- Divakara, S.T., Santosh, P., Aiyaz, M., Ramana, M.V., Hariprasas, P., Nayaka, S.C., Niranjana, S.R., 2013. Molecular identification and characterization of *Fusarium* spp. associated with sorghum seeds. *J. Sci. Food Agric.* 94, 1132–1139.
- FAO/WHO/UNEP, 1977. In: . Presented at the Conference on Mycotoxins Global Perspective on Mycotoxins, Nairobi, Kenya.
- FAOSTAT, 2010. Crops Primary Equivalent. Retrieved on 16th May, 2013 from [www.faostat.fao.org](http://www.faostat.fao.org).
- Frisvad, J.C., Frank, J.M., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Samson, R.A., 2004. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Stud. Mycol.* 50, 23–43.
- Glass, N.L., Donaldson, G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1323–1330.
- Godet, M., Munaut, F., 2010. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 304, 157–168.
- Gonzalez, H.H.L., Martinez, E.J., Resnik, S.L., 1997. Fungi associated with sorghum grain from Argentina. *Mycopathologia* 139, 35–41.
- ICRISAT/FAO, 1996. The World Sorghum and Millet Economies: Facts, Trend and Outlook. Published by FAO and ICRISAT. ISBN 92-5-103861-9. 68.
- Isakeit, T., Prom, L.K., Wheeler, M., Puckhaber, L.S., Liu, J., 2008. Mycotoxigenic potential of ten *Fusarium* species grown on sorghum and *in vitro*. *Plant Pathol. J.* 7, 183–186.
- Lefyedi, M.L., Marais, G.J., Dutton, M.F., Taylor, J.R.N., 2005. The microbial contamination, toxicity and quality of turned and unturned outdoor floor malted sorghum. *J. Inst. Brew.* 111, 190–196.
- Leslie, J.F., Zeller, K.A., Lamprecht, S.C., Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., 2005. Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. *Phytopathology* 95, 275–283.
- Lin, M.T., Dianese, J.C., 1976. A coconut agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology* 66, 1466–1469.
- Marasas, W.F.O., Burgess, L.W., Anelich, R.Y., Lamprecht, S.C., van Schalkwyk, D.J., 1988. Survey of *Fusarium* species associated with plant debris in South African soils. *South Afr. J. Bot.* 54, 63–71.
- O'Donnell, K., 1993. In: Reynolds, D.R., Taylor, J.W. (Eds.), *Fusarium and its Near Relatives. The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. CAB International, Wallingford.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., Plötz, R.C., 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 2044–2049.
- Oniang'o, R.K., Mutuku, J.M., Malaba, S.J., 2003. Contemporary African food habits and their nutritional and health implications. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 12, 231–236.
- Pedrosa, A.V.B., Dezen, R.B.O., 1991. O milho: características do mercado e perspectivas. *Preços Agric.* 55, 1–4.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B.F., Wheeler, K.A., Tanboon-Ek, P., 1994. The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 35–53.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 1997. *Fungi and Food Spoilage*, second ed. Aspen Publishing, Gaithersburg, MD, USA.
- Priyanka, S.R., Venkataramana, M., Kumar, G.P., Rao, V.K., Murali, H.C.S., Batra, H.V., 2014. Occurrence and molecular detection of toxigenic *Aspergillus* species in food grain samples from India. *J. Sci. Food Agric.* 94, 537–543.
- Prom, L.K., Isakeit, T., Perumal, R., Erpelding, J.E., Rooney, W., Magill, C.W., 2011. Evaluation of the Ugandan sorghum accessions for grain mold and anthracnose resistance. *Crop Prot.* 30, 566–571.
- Ratnavathi, C.V., Sashidhar, R.B., 2003. Substrate suitability of different genotypes of sorghum in relation to *Aspergillus* infection and aflatoxin production. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3482–3492.
- Scott, P.M., 2012. Recent research on fumonisins: a review. *Food additives and contaminants. Part A chemistry, analysis, control. Expo. Risk Assess.* 2, 242–248.
- Selma, M.V., Martinez-Culebras, P.V., Aznar, R., 2008. Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 122, 126–134.
- Sharma, R., Thakur, R.P., Senthilvel, S., Nayak, S., Reddy, S.V., Rao, V.P., Varshney, R.K., 2011. Identification and characterization of toxigenic *Fusaria* associated with sorghum grain mold complex in India. *Mycopathologia* 171, 223–230.
- Susca, A., Stea, G., Perrone, G., 2007. Rapid polymerase chain reaction (PCR)-single-stranded conformational polymorphism (SSCP) screening method for the identification of *Aspergillus* section *Nigri* species by the detection of calmodulin nucleotide variations. *Food Addit. Contam.* 24, 1148–1153.
- Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Sydenham, E.W., Shepar, G.S., Gelderblom, W.C.A., 1992. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia* 117, 3–9.
- Varga, J., Frisvad, J.C., Kocsubé, S., Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G., Samson, R.A., 2011. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud. Mycol.* 69, 1–17.
- Veiga, A.A., 1986. Aspectos económicos da cultura do sorgo. *Inf. Agropecu.* 12, 3–5.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. In: . Amplification and Direct Sequencing of Fungi Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics, Chap. PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, CA, pp. 315–322.



ORIGINAL ARTICLE

## Effects of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and aflatoxin B1 production by toxinogenic *Aspergillus flavus* isolates on sorghum seeds



Amani Lahouar<sup>a,b</sup>, Sonia Marin<sup>b</sup>, Ana Crespo-Sempere<sup>b</sup>, Salem Saïd<sup>a</sup>,  
Vicente Sanchis<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Biochemistry, Unity of Mycotoxicology, Faculty of Medicine of Sousse, University of Sousse, Sousse, Tunisia

<sup>b</sup> Food Technology Department, University of Lleida, XaRTA-UTPV, Agrotecnico center, Lleida, Spain

Received 23 May 2015; accepted 23 October 2015

Available online 23 February 2016

### KEYWORDS

Water activity;  
Incubation time;  
Temperature;  
*Aspergillus flavus*;  
Aflatoxin B1;  
Fungal growth

**Abstract** Sorghum, which is consumed in Tunisia as human food, suffers from severe colonization by several toxigenic fungi and contamination by mycotoxins. The Tunisian climate is characterized by high temperature and humidity that stimulates mold proliferation and mycotoxin accumulation in foodstuffs. This study investigated the effects of temperature (15, 25 and 37 °C), water activity ( $a_w$ , between 0.85 and 0.99) and incubation time (7, 14, 21 and 28 d) on fungal growth and aflatoxin B1 (AFB1) production by three *Aspergillus flavus* isolates (8, 10 and 14) inoculated on sorghum grains. The Baranyi model was applied to identify the limits of growth and mycotoxin production. Maximum diameter growth rates were observed at 0.99  $a_w$  at 37 °C for two of the isolates. The minimum  $a_w$  needed for mycelial growth was 0.91 at 25 and 37 °C. At 15 °C, only isolate 8 grew at 0.99  $a_w$ . Aflatoxin B1 accumulation could be avoided by storing sorghum at low water activity levels ( $\leq 0.91 a_w$ ). Aflatoxin production was not observed at 15 °C. This is the first work on the effects of water activity and temperature on *A. flavus* growth and AFB1 production by *A. flavus* isolates on sorghum grains.

© 2015 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Corresponding author.

E-mail address: [vsanchis@tecal.udl.cat](mailto:vsanchis@tecal.udl.cat) (V. Sanchis).

**PALABRAS CLAVE**

Actividad de agua;  
Tiempo de incubación;  
Temperatura;  
*Aspergillus flavus*;  
Aflatoxina B1;  
Crecimiento fúngico

**Efectos de la temperatura, la actividad de agua y el tiempo de incubación en el crecimiento fúngico y la producción de aflatoxina B1 por aislados toxicogénicos de *Aspergillus flavus* en sorgo**

**Resumen** El sorgo, que se consume en Túnez como alimento humano, puede sufrir la colonización severa de varios hongos toxicogénicos, con la consiguiente bioacumulación de micotoxinas. Además, el clima de Túnez, caracterizado por las altas temperaturas y humedad, estimula el crecimiento fúngico y la acumulación de micotoxinas en los productos alimenticios. Este estudio investigó los efectos de la temperatura (15, 25 y 37 °C), la actividad de agua ( $a_w$ ) (entre 0,85 y 0,99) y el tiempo de incubación (7, 14, 21 y 28 días) sobre el crecimiento y la producción de aflatoxina B1 (AFB1) de 3 aislados de *Aspergillus flavus* (designados como 8, 10 y 14) que se inocularon sobre granos de sorgo. El modelo Baranyi se aplicó para identificar los límites del crecimiento y la producción de micotoxinas. Las tasas máximas de crecimiento para 2 de los aislados se observaron en la combinación 0,99  $a_w$  y 37 °C. La  $a_w$  mínima necesaria para el crecimiento del micelio fue de 0,91 a 25 °C y 37 °C. A 15 °C, solo el aislado 8 creció a 0,99  $a_w$ , pero fue incapaz de producir la aflatoxina B1. Es posible evitar la acumulación de aflatoxina B1 en el sorgo almacenándolo a baja actividad de agua ( $\leq 0,91 a_w$ ). Este es el primer trabajo que ha estudiado el efecto de la actividad del agua y la temperatura sobre el crecimiento de aislados de *A. flavus* y su producción de aflatoxina B1 en granos de sorgo.

© 2015 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introduction

Aflatoxins are a group of toxic chemical compounds that are characterized by their immunotoxic, mutagenic and carcinogenic effects<sup>17</sup>. Aflatoxins are classified as group I carcinogens by the International Agency for Research on Cancer<sup>38</sup>. Among them, aflatoxin B1 (AFB1) is the most frequent and most potent toxin. *A. flavus* and to a lesser extent *Aspergillus parasiticus* are among the most widely studied fungal species, as a result of their ability to produce aflatoxins and their potential to persist pre- and post-harvest as a pathogen and saprophyte in the food supply.

The growth of molds and the accumulation of mycotoxins in food and feedstuff are influenced by multiple variables, such as water activity ( $a_w$ ), temperature, pH, atmosphere composition, substrate, interaction among species, and time<sup>3,37</sup>. Generally, relative humidity and temperature are considered to be the most critical factors during drying and storage<sup>14</sup>. Various physical and chemical methods have been recommended to reduce mycotoxins, but only a few have been accepted for practical use. Thus, the prevention of fungal growth and mycotoxin production represent key steps in risk management. Many kinetic models have been developed and used to model the growth of toxigenic molds in various food substrates. The effect of biotic and abiotic factors on growth and aflatoxin production have been widely studied using mathematical modeling<sup>4,6,14,16,18,20,28,39</sup>; however, no studies exist concerning their growth on sorghum seeds.

Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) is a drought-resistant crop and an important food resource in terms of nutritional and economic values, especially in semi-arid environments<sup>7</sup>. Sorghum grains can be colonized by several fungal genera during the panicle and grain development stages<sup>21,22</sup>. Several species of *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Curvularia* and *Penicillium* are

among the most prevalent grain mold pathogens in sorghum<sup>34</sup>. Moreover, a number of fungal isolates from this cereal primarily belonging to the genera *Fusarium* (*F. verticillioides*, *F. graminearum*, *F. equiseti*), *Alternaria* (*A. alternata*), *Aspergillus* (*A. flavus*), and *Penicillium* (*P. funiculosum*) have been reported to produce mycotoxins<sup>27,30,36</sup>.

The Tunisian climate is characterized by high temperature and humidity levels that seem to stimulate toxigenic mold growth and mycotoxin production. The Tunisian population consumes large amounts of cereals and cereal-based products, such as wheat, barley and sorghum. The occurrence of aflatoxins in commercialized sorghum in Tunisia was reported for the first time in 1977<sup>2</sup>, and several studies confirmed aflatoxin contamination in Tunisian sorghum<sup>1,8,9,10,19</sup>. According to Oueslati *et al.*<sup>10</sup>, AFB1-contaminated cereals represent a real problem for Tunisian consumers. Therefore, it is important to develop prevention and control strategies to minimize aflatoxin contamination in sorghum.

The objectives of the present work were to determine: (i) the effects of the interactions of water activity, temperature and incubation time on fungal growth and aflatoxin B1 production by Tunisian *Aspergillus flavus* isolates cultured on sorghum seeds and (ii) to identify the  $a_w$  and temperature limiting conditions for aflatoxin B1 production. The Baranyi model<sup>2</sup> was applied to predict the growth of aflatoxigenic isolates of *A. flavus* on sorghum seeds as a function of water activity and temperature. Elucidating the ecology and physiology of *A. flavus* will provide tools to manage AFB1 in sorghum.

## Materials and methods

### Fungal isolates

Three isolates of *A. flavus* (8, 10 and 14) were used in this study. The three isolates were obtained from sorghum sam-

ples collected from the retail market of the Sahel region in Tunisia in 2011 and were kept in the Food Technology department collection of the University of Lleida. All isolates were previously found to produce AFB<sub>1</sub> when cultivated in Czapeck Yeast Extract Agar (CYA) and sorghum seeds. The identification of the *A. flavus* isolates was done microscopically<sup>29</sup>. Molecular characterization of the isolates was also performed by PCR amplification using the primer pair AfAflT-F and AfAflT-R<sup>35</sup>. Two DNA extracts of *A. flavus* [CECT (Spanish Type Culture Collection) 2695 and *A. parasiticus* CECT 2681] were used as references.

### Experimental design and statistical analysis

A full factorial design of three temperatures (15, 25 and 37 °C) × six water activities ( $a_w$ ) (0.85, 0.88, 0.91, 0.94, 0.97 and 0.99) × three isolates (8, 10 and 14) was used. Colony diameters and AFB<sub>1</sub> production after 7, 14, 21 and 28 d were the dependent variables. Three replicates were included for each treatment. The effects of temperature and  $a_w$  on mycelial growth and AFB<sub>1</sub> production after 7, 14, 21 and 28 d were statistically analyzed by analysis of variance (ANOVA) using Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics, Inc., MD, USA).

### Preparation of sorghum

The study was performed *in vitro* on sorghum grains. To determine the growth and aflatoxin patterns on sorghum grains, different amounts of water (calculated from a moisture absorption curve for the sorghum batch used) were added to subsamples of 100 g of grain in flasks. The sorghum was allowed to equilibrate at 4 °C for 48 h with periodic shaking. Once sealed, the flasks were autoclaved for 20 min at 121 °C, and then single layers of grain were carefully placed in 9 cm sterile plastic Petri dishes on a flow bench. The final  $a_w$  levels were 0.85, 0.88, 0.91, 0.94, 0.97 and 0.99. All  $a_w$  values were verified with an AquaLab 3 (Decagon Devices, Inc., WA, USA) with an accuracy of ±0.003 before, during and at the end of the experiment.

### Inocula preparation and incubation

*A. flavus* isolates were sub-cultured on potato dextrose agar (PDA) plates and incubated at 25 °C for 7 d to enable significant sporulation. After incubation, a sterile inoculation loop was used to remove the conidia from the PDA plates. The conidia were suspended in an aqueous solution of 0.05% (w/v) Tween 80. After homogenizing, the spore concentrations were determined using the Thoma cell counting chamber. The suspensions were diluted to adjust the final concentration to vary between 1 and 5 × 10<sup>5</sup> spores/ml. Triplicate plates with single layers of sorghum for each water activity and temperature combination were inoculated centrally with a needlepoint load and incubated for 28 d. Previous experiments showed that the number of spores inoculated through this technique was 10–100 spores on each inoculation point. The incubation temperatures for all three isolates were 15, 25 and 37 °C, and the  $a_w$  values were 0.85, 0.88, 0.91, 0.94, 0.97 and 0.99. Plates with the same temperature and  $a_w$  level were stacked in plastic

chambers together with 250 ml of glycerol/water solution of the same  $a_w$  to maintain the relative humidity equilibrium in the chambers as constant as possible.

### Growth measurement and growth rate calculation

The diameter of each growing colony was determined by measurement of two right-angled rays of the colony. Measurements were recorded daily during the 28 d of growth. The growth rate ( $\mu$ ) (mm/d) and growth time ( $\lambda$ ) (d) were evaluated for each isolate at each different combination of  $a_w$  and temperature by plotting the colony diameter extension (mm) against time (d) and fitting the Baranyi<sup>2</sup> model using Statgraphics Plus. This model represents the three growth phases (lag, linear, and asymptotic phase). The proposed primary model has the general form of:

$$y = y_0 + \mu_{\max} A - \ln \left( 1 + \frac{[\exp(\mu_{\max} [A]^{-1})]}{\exp(y_{\max} - y_0)} \right)$$

$$A = t + \left( \frac{1}{\mu_{\max}} \right) \ln [\exp(-\mu_{\max} t) + \exp(-\mu_{\max} \lambda) - \exp(-\mu_{\max} t - \mu_{\max} \lambda)]$$

Where  $y$  is the colony diameter (or radius),  $y_0$  is the initial colony diameter (or radius, usually zero),  $y_{\max}$  is the maximum colony diameter (or radius) attained (asymptotic value),  $\mu_{\max}$  is the maximum specific growth rate (defined as the slope of the growth curve at the point of inflexion),  $\lambda$  is the lag period (*i.e.* the intersection of the line defining the maximum specific growth rate with the x-axis), and  $t$  is the time.

### Aflatoxin B<sub>1</sub> production and quantification

AFB<sub>1</sub> production was determined after 7 and 14 d of incubation under the optimal growth conditions [at 25 °C (0.97 and 0.99  $a_w$ ) and at 37 °C (0.94, 0.97, and 0.99  $a_w$ )] and after 21 and 28 d of incubation under suitable but not optimal conditions [at 37 °C (0.91  $a_w$ ), at 25 °C (0.91 and 0.94  $a_w$ ) and at 15 °C (0.99  $a_w$ )] (Table 1). AFB<sub>1</sub> was extracted from the sorghum samples (20 g) with 100 ml of 4% acetonitrile aqueous solution containing potassium chloride (9:1). The mixture was adjusted to a pH of 1.5 with undiluted hydrochloric acid, shaken for 20 min and filtered through a Whatman paper. The filtrate was defatted with 100 ml of hexane. The solution was shaken for 10 min. After separation, the upper phase (hexane) was discarded. This step was repeated with 50 ml of hexane. The lower phase was extracted with 50 ml of chloroform and 50 ml of deionized water, and the solution was shaken for 10 min. After separation, the lower phase (chloroform) was collected. The upper phase was re-extracted twice with 25 ml of chloroform and 25 ml of deionized water. The chloroform extracts were evaporated to near dryness using a rotary evaporator at 40 °C. AFB<sub>1</sub> was resuspended in 2 ml of methanol and evaporated to dryness under nitrogen. Finally, the sample was analyzed with HPLC.

**Table 1** Minimal conditions for aflatoxin B1 (AFB1) production by three Tunisian *Aspergillus flavus* isolates on sorghum seeds

Isolate	Temperature (°C)	Water activity ( $a_w$ )	Incubation time (d)	AFB1 concentration (ng/g) <sup>a</sup>
8	37	0.94	7	0.23 ± 0.34
	25	0.94	21	0.11 ± 0.02
10	37	0.97	7	1.33 ± 0.28
	25	0.97	14	0.22 ± 0.08
14	37	0.97	7	1.64 ± 0.28
	25	0.97	14	0.17 ± 0.06

<sup>a</sup> Detection limit = 0.075 ng/g.

The determination of AFB1 was performed using a Waters (Milford, MA, USA) chromatograph equipped with a reverse phase C<sub>18</sub> silica gel column (Water Spherisorb 3 μm ODS2 4.6 × 150 mm, Milford, MA, USA), followed by fluorescence detection ( $\lambda_{exc}$  362 nm;  $\lambda_{em}$  425 nm) (Waters 2475 Fluorescence Detector, Waters, Milford, MA, USA). The mobile phase consisted of water–acetonitrile–methanol (700:170:170) with a flow rate of 1 ml/min. The detection limit (LOD) of the method was 0.075 ng/g. The injection volume was 10 μl, and the retention time was 8 min. Post-column derivatization was achieved using a photochemical reactor for enhanced detection (PHRED) (LCTech UVE, Dorfen, Germany).

## Results and discussion

Previous works noted that data obtained regarding mycotoxin production on culture media could not be directly extrapolated to the natural substrates<sup>40</sup>. Thus, the present study was performed directly on sorghum grains.

### Effects of water activity and temperature on mycelial growth

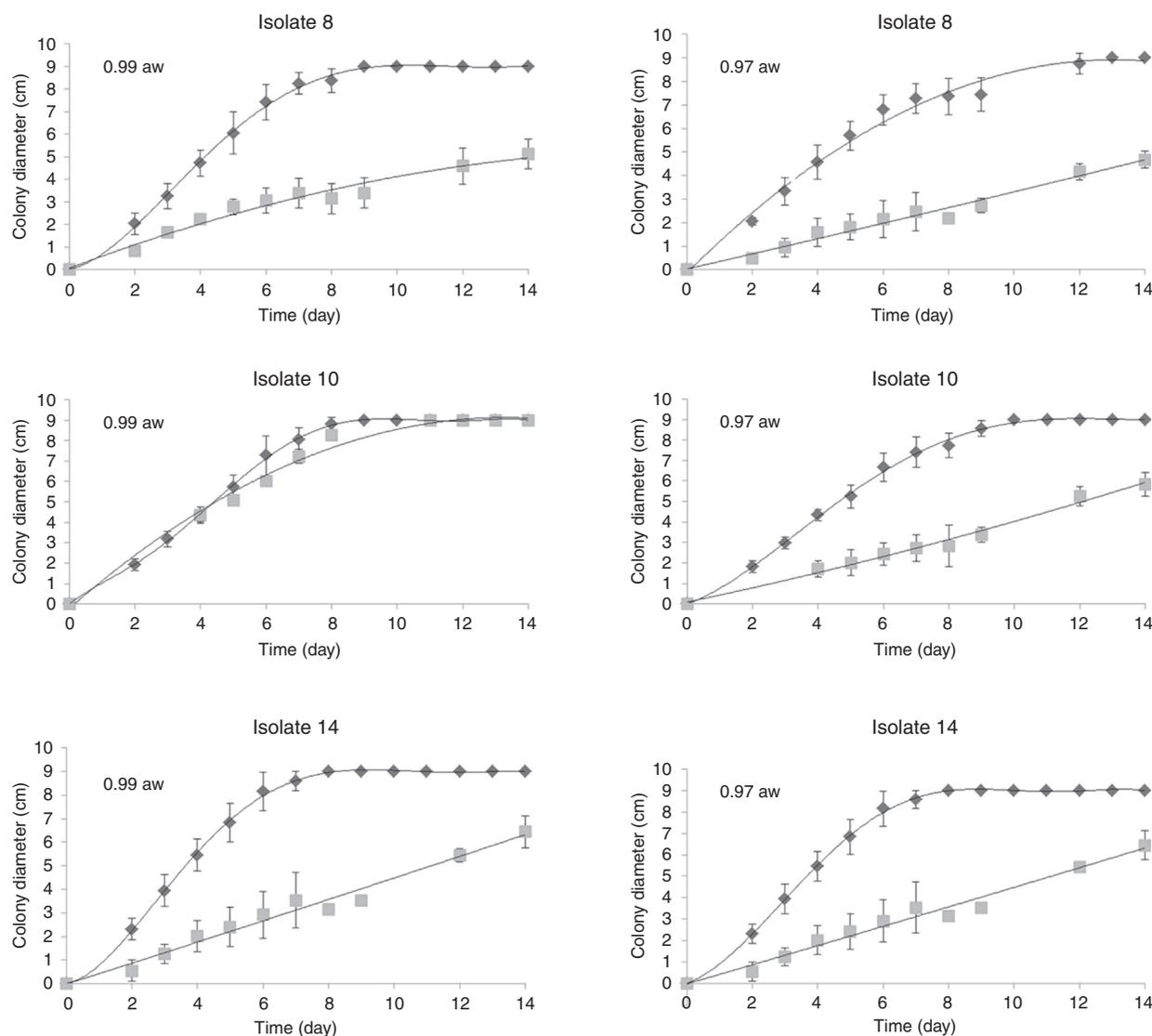
Figure 1 shows an example of the observed colony diameters for *A. flavus* isolates 8, 10 and 14 at two water activities (0.90 and 0.97) and their respective growth adjusted to the Baranyi model. Under optimum growth conditions, the colony diameters increased linearly until the colonies reached the edge of the Petri dishes. Under limiting growth conditions, a clear lag time was observed prior to growth (Fig. 2). The Baranyi model was used to determine two growth parameters: the lag phases (d) and the growth rates (mm/d). The percentage of variance explained by the model ( $R^2$  coefficient) obtained for the different treatments (combinations) varied between 85.85% and 99.83%, with 31 combinations showing no growth and only two combinations exhibiting 54 < 90%. The low MSEs (0.017–0.673) and the high  $R^2$  values (85.85–99.83%) indicated that the evaluated model could sufficiently determine the growth parameters.

Analysis of variance for the growth rate showed that the single factors  $a_w$  and temperature and the interactions isolate × temperature,  $a_w$  × temperature and isolate ×  $a_w$  × temperature had significant influences on the growth rate ( $p < 0.05$ ). On average, the three isolates behaved similarly, as noted by Mohale et al.<sup>24</sup> with atoxigenic and toxigenic strains of *A. flavus*. The combined effects of  $a_w$  and temperature on the growth rates (mm/d) of the three isolates tested are shown in Fig. 2. The maximum

growth rates achieved were 16.29, 14.91 and 14.22 mm/d by isolates 14, 8 and 10, respectively, at 37 °C and 0.99  $a_w$ . In this study, the optimum temperature for growth was 37 °C for all  $a_w$  levels tested (Fig. 2). Additionally, 25 °C was a very favorable temperature and yielded high growth rates. Similar results for *A. flavus* isolates were found by Horn<sup>23</sup>. The extent of seed colonization by *Aspergillus* section *Flavi* grew with the increase of water activity and temperature to the optimal conditions of  $a_w = 0.96$  and 37 °C. Samapundo et al.<sup>33</sup> showed that *A. flavus* had optimum growth on corn at 30 °C. Schindler et al.<sup>28</sup> reported that growth of *A. flavus* was most favored in wort agar between 29 and 35 °C. Temperatures between 25 and 37 °C were not tested in our study; however, the mycelial extension of Tunisian *A. flavus* isolates was significantly higher at 37 °C than at 25 °C ( $p < 0.05$ ). Figure 2 showed that very short lag phases were encountered at high temperatures (25 and 37 °C) and  $a_w$  (0.97 and 0.99  $a_w$ ). The shorter lag phase period was observed for isolates 10 and 8 at 25 °C and for isolate 14 at 37 °C. Samapundo et al.<sup>33</sup> showed that an increase in temperature from 30 to 37 °C resulted in a decrease in the colony growth rate and an increase in the lag phase.

No growth was detected at 15 °C at any of the  $a_w$  conditions tested for isolates 10 and 14; however, isolate 8 grew at 0.99  $a_w$ . The minimum growth rate observed was 0.9 mm/d, which was calculated for isolate 14 at 37 °C and 0.91  $a_w$ . No growth was detected for isolates 10 and 14 at 25 °C and 0.91  $a_w$ . However, at 37 °C all isolates grew at 0.91  $a_w$ . No growth at 0.85 and 0.88  $a_w$  was detected after 28 d at all tested temperatures. However, Pitt and Miscamble<sup>11</sup> reported that the minimum water activity for growth of *A. flavus* was between 0.80 and 0.83. The discrepancy in these results may be due to differences in the media used and the availability of nutrients. Some components of the pericarp layer of the grain, such as tannins and high levels of phenol-based pigments, and some antifungal proteins can affect fungal growth<sup>11</sup>. Similar studies have also indicated that the availability of nutrients may affect the chances of growth at marginal  $a_w$  values<sup>13</sup>.

Maximum growth rates were observed for the three isolates at 25 and 37 °C at 0.97 and 0.99  $a_w$ . Additionally, the *A. flavus* isolates assayed grew faster at 0.99  $a_w$  than at 0.97  $a_w$  at 25 and 37 °C, with the exception of isolate 14, where the optimum water activity for growth was 0.97  $a_w$  at 25 °C. Similar results were reported by Marin et al.<sup>18</sup> for *A. flavus* grown on maize extract agar, where the optimal  $a_w$  for growth was 0.994. However, the optimum water activity for growth in some studies was somewhat different from the conditions demonstrated by our data. For instance,



**Figure 1** Effect of water activity (0.99 and 0.97) and temperature 37°C (◆) and 25°C (■) on colony diameter (cm) of three *A. flavus* isolates (8, 10 and 14) on single layers of sterile sorghum grains. Values of three replicated are plotted and adjusted with Baranyi's model.

Horn<sup>23</sup> found that the optimum water activity for growth was 0.96  $a_w$ . These differences can be attributed to intraspecific and regional variability among isolates.

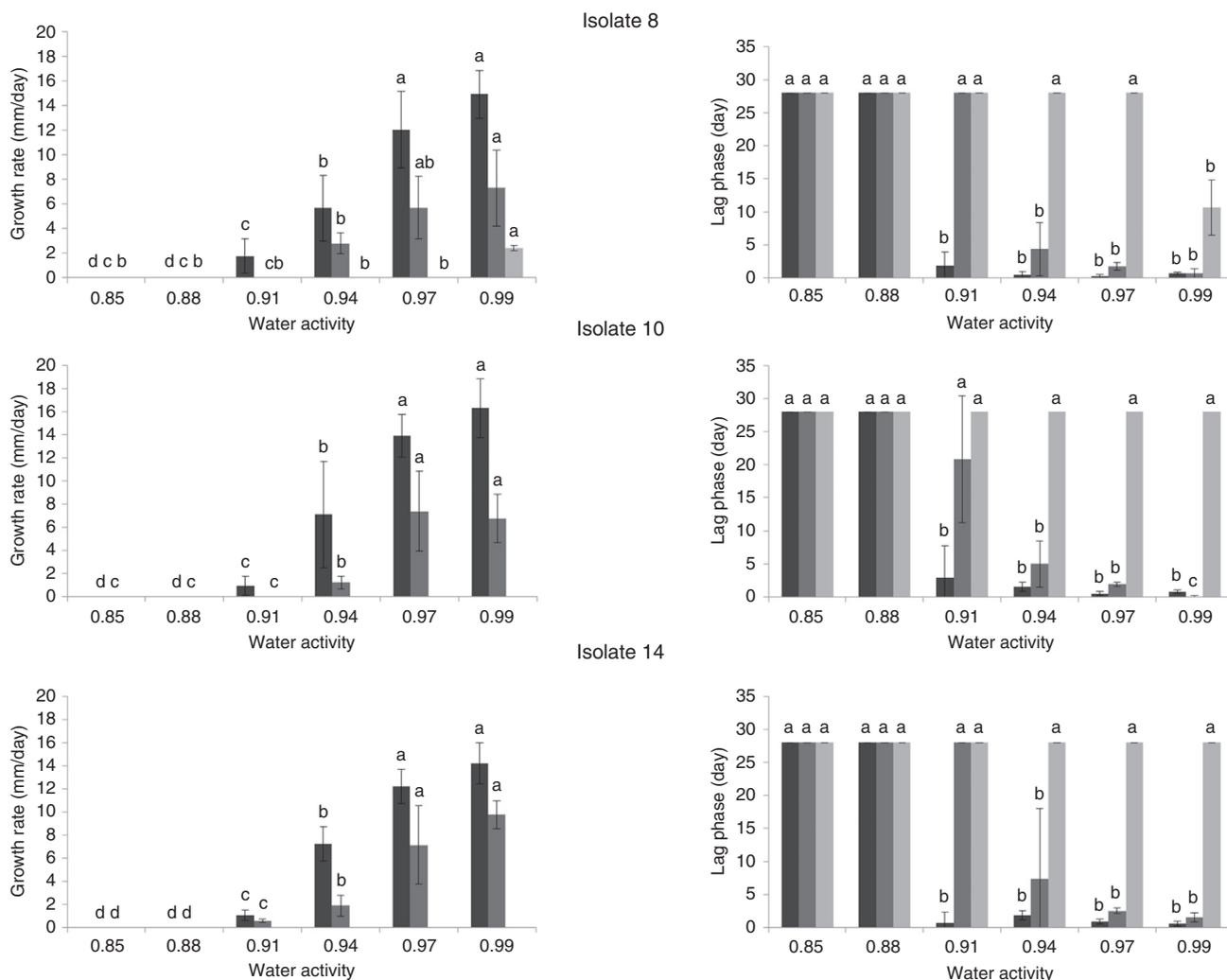
### Effects of water activity and temperature on aflatoxin B1 production

AFB1 was the only metabolite considered in the data analysis because AFB2 was rarely detected and only in trace amounts whereas aflatoxins G1 and G2 were never detected. AFB1 has been reported to be the major AFB in natural substrates such as sorghum<sup>1,9,10</sup>. A similar situation was reported by Giorni et al.<sup>41</sup>.

Analysis of variance of the effects of  $a_w$  and temperature on AFB1 production by the three *A. flavus* isolates revealed that the single factors  $a_w$  and temperature and the interactions temperature  $\times$  isolates,  $a_w \times$  incubation time and temperature  $\times$  incubation time had a significant effect on

AFB1 production after 7 and 14 d of growth on sorghum seeds ( $p < 0.05$ ). After 21 and 28 d, only the single factors  $a_w$  and temperature and the interaction between water activity and isolates significantly affected AFB1 accumulation ( $p < 0.05$ ).

The maximum accumulation of AFB1 (2.26 ppb) was observed for isolate 8 at 37°C and 0.99  $a_w$  after 7 d of incubation (Fig. 3). Generally, at 37°C and 25°C AFB1 accumulation grew with increasing water activities (0.97 and 0.99  $a_w$ ). No significant differences were found between 0.99 and 0.97  $a_w$  ( $p < 0.05$ ) at 37°C after 7 d of incubation. At 37°C, significantly higher amounts of AFB1 ( $p < 0.05$ ) were produced by the three *A. flavus* isolates at 0.97 and 0.99  $a_w$ . However, Montani et al.<sup>32</sup> found that the most favorable  $a_w$  for aflatoxin production was 0.90  $a_w$  at all incubation times studied. In this study, the only isolate that produced AFB1 at 0.94 was isolate 8, which produced 0.23 ng/g at 37°C after 7 d of incubation and 0.105 ng/g at 25°C after 21 d. To determine the minimum  $a_w$  that allowed aflatoxin production, we tested  $a_w$  values of 0.85, 0.88 and 0.91  $a_w$ . AFB1 was not detected at



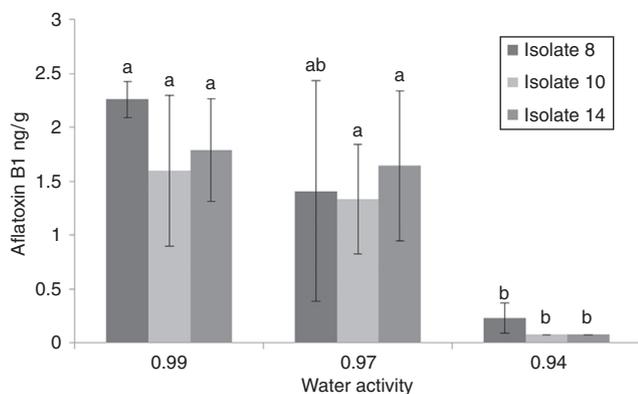
**Figure 2** Effect of water activity and temperature on growth rate (mm/day) and lag phases (day) of three *A. flavus* isolates (8, 10 and 14) on single layers of sterile sorghum grains at different temperatures 37 (■), 25 (■) and 15 °C (■). If all letters next to a bar are different from the letters in another bar, there are significant differences among the treatments, if they have a common letter, they are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

25 and 37 °C, whereas growth occurred at 0.91  $a_w$  and 37 °C. AFB1 was detected under a narrower range of water activity than the range that allowed growth (0.94 and 0.99  $a_w$ ). Consequently, it may be possible to avoid aflatoxin accumulation from these strains by storing the commodities at "safe" water activity levels ( $\leq 0.91 a_w$ ). At 15 °C, AFB1 was not detected (Table 1). Hunter<sup>31</sup> proposed 0.84  $a_w$  as the minimal value for aflatoxin production in corn, and Astoreca *et al.*,<sup>26</sup> proposed 0.83 as the minimum value in corn extract medium.

Several researchers reported a different behavior of the *A. flavus* isolates regarding temperature, with optimum values varying from 25 to 30 °C regardless of the media<sup>5,12,25</sup>. For instance, Schindler *et al.*<sup>28</sup>, reported that maximal production of aflatoxins on wort media occurred at 24 °C, whereas the optimal temperature for AFB1 production was 35 °C.

The incubation period that allowed higher AFB1 accumulation depended on the temperature, water activity and isolate tested. At the optimal temperature (37 °C) and 0.99  $a_w$ , all isolates required 7 d to reach maximum

AFB1 production; no AFB1 production was detected after 14 d under the same conditions. At water activities above 0.94  $a_w$ , AFB1 accumulated at 37 °C was lower after 14 d of incubation on sorghum grains than after 7 d ( $p < 0.0001$ ). The results showed that the optimal  $a_w$  for AFB1 accumulation at 25 °C was 0.99  $a_w$ . At 25 °C, the amounts of AFB1 detected at 0.97 and 0.99  $a_w$  after 14 d of incubation increased compared to the amounts produced after 7 d of incubation, with the exception of isolate 8 at 0.99  $a_w$ , whose AFB1 accumulation was higher after 7 d of incubation ( $p < 0.001$ ). AFB1 decrease following the peak of maximum production was observed under the optimal conditions (37 °C and 0.97–0.99  $a_w$ ). The decrease in AFB1 concentration may be explained by its degradation caused by the mold itself. The detection of AFB1 after 21 d and 28 d of incubation showed that only isolate 8 produced AFB1 at 0.94  $a_w$  and 37 °C and 25 °C after 7 and 21 d, respectively. *A. flavus* species comprise a high number of isolates with certain genetic variability, which explains why the expression of genes involved in the aflatoxin metabolic pathway is dependent on the environmental conditions.



**Figure 3** Comparison aflatoxin B1 (AFB1) production by 3 *Aspergillus flavus* isolates after 7 days of incubation on sorghum seeds at different water activities (0.94, 0.97 and 0.99) (A, B, C, D). If all letters next to a bar are different from the letters in another bar, there are significant differences among the treatments, if they have a common letter, they are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

In our study, maximum AFB1 production could not be linked to a specific time point after inoculation, but overall 7 d of incubation was generally sufficient for *A. flavus* to achieve important AFB1 accumulation under the optimal conditions for AFB1 production (37 °C and 0.97–0.99  $a_w$ ). Nevertheless, the optimum incubation period and temperature required for maximum AFB1 production varied, probably due to the set of conditions tested, the nature and composition of the substrate and intraspecific and regional variability among isolates.

In this study, maximal growth was correlated with maximal aflatoxin production (0.99  $a_w$  and 37 °C). However, other studies have shown that good growth may occur without any production of aflatoxins. For example, Rabie and Smalley<sup>15</sup> demonstrated that the maximal production of aflatoxins occurred at 24 °C, but the maximal growth of *A. flavus* isolates occurred at 29 and 35 °C.

This is the first study concerning the effect of water activity and temperature on *A. flavus* growth and AFB1 production on sorghum grains.

The optimal conditions for mycelial growth and AFB1 production were 0.99  $a_w$  and 37 °C. There was neither *A. flavus* growth nor AFB1 production at 0.85 and 0.88  $a_w$  at all temperatures investigated. Consequently, aflatoxin accumulation could be avoided by storing sorghum at low water activity levels ( $\leq 0.91 a_w$ ). Our results showed that *A. flavus* isolated from Tunisian sorghum was able to grow in a wide range of water activities (0.91–0.99  $a_w$ ) and temperatures (15–37 °C), however, the production of AFB1 occurred at a narrower range of water activities (0.94–0.99  $a_w$ ) and temperatures (25–37 °C). Within the range of  $a_w$  evaluated in this study, 0.94 was the limiting level for AFB1 production. The investigation of trends for growth and AFB1 production at different temperatures and water activities in sorghum seeds can provide important information concerning the contamination of sorghum by AFB1. Our study contributes to the understanding of the ecology and physiology of Tunisian *A. flavus* isolates.

## Ethical disclosures

**Protection of human and animal subjects.** The authors declare that no experiments were performed on humans or animals for this investigation.

**Confidentiality of data.** The authors declare that no patient data appears in this article.

**Right to privacy and informed consent.** The authors declare that no patient data appears in this article.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## Acknowledgments

We thank M. Prim for her encouragement and technical assistance. The authors are grateful to the European Union (MYCORED KBBE-2007-2-5-05 project) and Tunisian Government for financial support.

## References

- Alves dos Reis T, Zorzete P, Pozzi CR, da Silva VN, Ortega E, Correa B. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian sorghum from sowing to harvest. *J Sci Food Agric.* 2010;90:1445–51.
- Arrus K, Blank G, Abramson D, Clear R, Holley RA. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *J Stored Prod Res.* 2005;41:513–27.
- Astoreca A, Vaamonde G, Dalcerro A, Marin S, Ramos AJ. Abiotic factors and their interactions influence on the co-production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* isolated from corn. *Food Microbiol.* 2014;38:276–83.
- Asurmendi P, Barberis C, Pacual L, Dalcerro A, Barberis L. Influence of *Listeria monocytogenes* and environmental abiotic factors on growth parameters and aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. *J Stored Prod Res.* 2015;60:60–6.
- Bandopadhyay R, Butler DR, Chandrasekhar A, Reddy RK, Navi SS. Biology epidemiology and management of sorghum grain mold. In: Chandrashekar A, Bandyopadhyay R, Hall AJ, editors. Technical and institutional options for sorghum grain mold management: proceedings of an international consultation. ICRISAT: Andhra Pradesh, India; 2000. p. 34–71.
- Baranyi J, Roberts TA. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol.* 1994;23:277–94.
- Boutrif E, Jemmali M, Campbell AD, Pohland AE. Aflatoxin in Tunisian foods and foodstuffs. *Ann Nutr Aliment.* 1977;31:431–4.
- Dantigny P, Guilmar A, Bensoussan M. Basis of predictive mycology. *Int J Food Microbiol.* 2005;100:187–96.
- Da Silva JB, Dilkin P, Fonseca H, Correa B. Production of aflatoxins by *Aspergillus flavus* and of fumonisins by *Fusarium* species isolated from Brazilian sorghum. *Braz J Microbiol.* 2004;35:182–6.
- Diener UL, Davis ND. Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. *Phytopathology.* 1966;56:1390–3.
- Garcia D, Ramos AJ, Sanchis V, Marin S. Predicting mycotoxins in foods: a review. *Food Microbiol.* 2009;26:757–69.
- Garcia D, Ramos AJ, Sanchis V, Marin S. Intraspecific variability of growth and patulin production of *Penicillium*

- expansum* isolates at two temperatures. Int J Food Microbiol. 2011;151:195–200.
13. Garcia D, Ramos AJ, Sanchis V, Marin S. Modeling kinetics of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in maize-based medium and maize grain. Int J Food Microbiol. 2013;162:182–9.
  14. Ghali R, Hmaissia-khlifa K, Ghorbel H, Maaroufi K, Hedili A. Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Tunisian foods. Food Control. 2008;19:921–4.
  15. Ghali R, Hmaissia-khlifa K, Ghorbel H, Maaroufi K, Hedili A. Aflatoxin determination in commonly consumed foods in Tunisia. J Sci Food Agric. 2010;90:2347–51.
  16. Giorni P, Magan N, Pietri A, Battilani P. Growth and aflatoxin production of an Italian strain of *Aspergillus flavus*: influence of ecological factors and nutritional substrates. World Mycotoxin J. 2011;4:425–32.
  17. Godet M, Munaut F. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. FEMS Microbiol Lett. 2010;304:157–68.
  18. Horn BW. Colonization of wounded peanut seeds by soil fungi: selectivity for species from *Aspergillus* section *Flavi*. Mycologia. 2005;97:202–17.
  19. Hunter JH [PhD Thesis] Growth and aflatoxin production in shelled corn by the *Aspergillus flavus* group as related to relative humidity and temperature. Purdue Univ D; 1969 [Abstr 30 1447 B].
  20. IARC. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some naturally occurring substances. Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, vol. 56. Lyon, France: IARC; 1993. p. 397–444.
  21. Isakeit T, Prom LK, Wheeler M, Puckhaber LS, Liu J. Mycotoxigenic potential of ten *Fusarium* species grown on sorghum and *in vitro*. Plant Pathol J. 2008;7:183–6.
  22. Marin S, Colom C, Sanchis V, Ramos AJ. Modelling of growth of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* from red chilli powder as a function of water availability. Int J Food Microbiol. 2009;128:491–7.
  23. Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V. Mycotoxins occurrence, toxicology, and exposure assessment. Food Chem Toxicol. 2013;60:218–37.
  24. Marin S, Ramos AJ, Sanchis V. Modelling *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in pistachio nuts. Food Microbiol. 2012;32:378–88.
  25. Marin S, Sanchis V, Saenz R, Ramos AJ, Vinas I, Magan N. Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from corn grain. J Appl Microbiol. 1998;84:25–36.
  26. Mohale S, Magan N, Medina A. Comparison on growth, nutritional utilization patterns, and niche overlap indices of toxigenic and atoxigenic *Aspergillus flavus* strains. Fungal Biol. 2013;117:650–9.
  27. Montani ML, Vaamonde G, Resnik SL, Buera P. Water activity influence on aflatoxin accumulation in corn. Int J Food Microbiol. 1988;6:349–53.
  28. Mousa W, Ghazali FM, Jinap S, Ghazali HM, Radu S. Modelling the effect of water activity and temperature on growth rate and aflatoxin production by two isolates of *Aspergillus flavus* on paddy. J Appl Microbiol. 2011;111:1262–74.
  29. Oueslati S, Blesa J, Molto JC, Ghorbel A, Mañes J. Presence of mycotoxin in sorghum and intake estimation in Tunisia. Food Addit Contam A. 2014;31:307–18.
  30. Oueslati S, Romero-Gonzalez R, Lasram S, Garrido-frenich A, Martinez-Vidal JL. Multi-mycotoxin determination in cereals and derived products marketed in Tunisia using ultra-high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. Food Chem Toxicol. 2012;50:2376–81.
  31. Pardo E, Marin S, Sanchis V, Ramos AJ. Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity. Int J Food Microbiol. 2004;95:79–88.
  32. Pitt JI, Miscamble BF. Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. J Food Prot. 1995;58:86–90.
  33. Proietti I, Frazzoli C, Mantovani A. Exploiting nutritional value of staple foods in the world's semi-arid areas. Risks, benefits, challenges and opportunities of sorghum. Healthcare. 2015;3:172–93.
  34. Rabie CJ, Smalley EB. Influence of temperature on the production of aflatoxin. In: Symposium on mycotoxins in foodstuffs. 1965. p. 18–29.
  35. Rodriguez-Herrera R, Waniska RD, Rooney WL. Antifungal proteins and grain mold resistance in sorghum with non-pigmented testa. J Agric Food Chem. 1999;47:4802–6.
  36. Samapundo S, Devlieghere F, Geeraerd AH, De Meulenaer B, Van Impe JF, Debevere J. Modelling of the individual and combined effects of water activity and temperature on the radial growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on corn. Food Microbiol. 2007;24:517–29.
  37. Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filteborg O. Introduction to food-and airborne fungi. 6th ed. Utrecht: Centraalbureau voor schimmelcultures; 2000.
  38. Sautour M, Dantigny P, Divies C, Bensoussan M. A temperature-type model for describing the relationship between fungal growth and water activity. Int J Food Microbiol. 2001;67:63–9.
  39. Schindler AP, Palmer JG, Eisenberg WV. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperatures. Appl Microbiol. 1967;15:1006–9.
  40. Serrano AB, Font G, Ruiz MJ, Ferrer E. Co-occurrence and risk assessment of mycotoxin in food and diet from Mediterranean area. Food Chem. 2012;135:423–9.
  41. Waliyar F, Ravinder RC, Alur AS, Reddy BVS, Reddy AR, Gowda CLL. Management of grain mold and mycotoxins in sorghum. Patancheru, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for Semi-Arid Tropics; 2007, 32 pp.