

THESE

Présentée pour obtenir

**LE TITRE DE DOCTEUR
DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE
ET DE L'UNIVERSITE DE BUCAREST**

**Spécialité : PATHOLOGIE, MYCOLOGIE, GENETIQUE
ET NUTRITION**

Par

Cristina TABUC

FLORE FONGIQUE DE DIFFERENTS SUBSTRATS ET CONDITIONS OPTIMALES DE PRODUCTION DES MYCOTOXINES

Soutenue le 6 décembre 2007, devant un jury composé de :

OSWALD Isabelle	INRA, Toulouse, France	Président
ROUSSOS Sevastianos	Université Paul Cézanne, Marseille, France	Rapporteur
TARANU Ionelia	IBNA, Balotesti, Roumanie	Rapporteur
GUERRE Philippe	ENV, Toulouse, France	Examineur
SESAN Tatiana	Université de Bucarest, Roumanie	Examineur
BAILLY Jean-Denis	ENV, Toulouse, France	Examineur

**UPSP de Mycotoxicologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Laboratoire Biologie Animale, IBNA Balotesti**

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à adresser toute ma gratitude à **Jean-Denis Bailly** sans lequel ce travail n'aurait pu aboutir. Je le remercie pour sa gentillesse, son soutien et pour le fait de m'avoir fait partager son expérience. Je lui adresse toute ma reconnaissance pour sa patience, sa disponibilité et sa participation active lors de la rédaction des articles et de la thèse.

Je remercie également mes directeurs de thèse **Jean-Denis Bailly** (encore une fois) et **Tatiana Sesan** pour leur confiance et leur soutien. Merci à Jean-Denis Bailly pour le fait de m'avoir accueilli dans son équipe et pour ses conseils toujours pertinents. Je remercie Tatiana Sesan non seulement pour son soutien moral et professionnel pendant la thèse mais aussi pendant toutes les années d'études.

J'exprime également mes remerciements et ma reconnaissance à **Isabelle Oswald** sans laquelle ma venue en France n'aurait pas été possible.

Je remercie très sincèrement **Sevastianos Roussos** et **Ionelia Taranu** qui ont accepté d'examiner notre travail avec bienveillance.

Mes remerciements s'adressent à **Philippe Guerre** qui nous a inspiré ce sujet de thèse et qui a porté un intérêt tout particulier à notre travail. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Merci aussi à **Pierrette Le Bars** et **Sylviane Bailly** pour leur gentillesse et pour tous les secrets dévoilés de la mycologie microscopique.

Un grand merci pour **Didier Tardieu** et **Claudine Condomines** (UP, Pharmacie Toxicologie) qui m'ont appris les méthodes d'analyse de laboratoire nécessaires pour ce travail. Je leur adresse tout mon respect pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Je tiens à remercier toute l'équipe d'**HIDA OA** et toutes les personnes avec qui j'ai partagé des bons moments et qui ont rendu plus agréable mon séjour au sein de cette équipe. Je leur serai toujours reconnaissante pour leur aide et leurs conseils et je pense spécialement à **Marie-Rose** (pour son dévouement et sa gentillesse), **Alain** (pour sa taquinerie géographique, linguistique et culinaire), **Monique** (pour ses conseils en français), **Arlette** (pour ses conseils et ses encouragements), **Jean-Pierre** (pour ses histoires et sa bonne humeur).

Également je remercie **mon père** et **ma soeur** pour les efforts et les sacrifices faits pour que je puisse réaliser mes rêves et aussi **Françoise Jugie** qui m'a énormément aidée, soutenue et abritée pendant tous mes séjours en France.

Pour les moments extraordinaires passés ensemble je tiens à remercier mes amis de diaspora roumaine: **Ciprian, Daniel, Dragos, Dorina, Valentin, Mihaela, Loredana, Rodica, Marian, Carmen** et **Nicu**.

Un grand merci aux collègues roumains **Daniela, Radu** et **Cornelia** également pour leur soutien et aussi à **Lucia, Nina, Anca, George, Vova, Gina, Lumi**, ... pour leur fidèle soutien pendant les années d'études et pour tous les excellents souvenirs.

A tous ce que j'ai oubliés, mais qui se reconnaîtront ici.

Enfin, merci à **Chucky**, la crème des chiens, dédicace ridicule et sans intérêt pour certains, mais sans doute la plus méritée pour tout ce que je lui ai fait subir et tout ce qu'il devra supporter encore longtemps !

Ce travail a fait l'objet des publications suivantes:

Tabuc C., Bailly J.D., Bailly S., Querin A., Guerre P., 2004 : Toxigenic potential of *Penicillium* strains isolated from dry cured meat products and stability of produced toxins, *Rev. Med. Vet.*; 155, 5, 287-291

Bailly J.D., **Tabuc C.** Querin A. Guerre P., 2005 : Production and stability of Patulin, OTA, Citrinin and CPA in dry cured ham, *J. Food Prot.*, 68 (7), 1516-1520

Trung T.S., **Tabuc C.**, Bailly S., Querin A., Guerre P., Bailly J.D., 2007 : Fungal mycoflora and contamination of maize from Vietnam with fumonisin B1 and aflatoxin B1, *World Mycotoxin Journal*, *sous presse*

Tabuc C., Marin D., Guerre P., Sesan T, Bailly J.D., 2007 : Aflatoxin B1, deoxynivalenol and zearalenone contamination of cereals in South-East Romania, *J. Food Prot.*, *soumis*

Financement

Ces travaux ont été financés en partie dans le cadre de **Réseaux Formation Recherche** N° : 365

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
PCR	Polymerase chain reaction
SIDA	Syndrome immunodéficientaire acquis
HIV	Human immunodeficiency virus
PDA	Potato dextrose agar
AFB1	Aflatoxine B₁
AFB2	Aflatoxine B₂
AFG1	Aflatoxine G₁
AFG2	Aflatoxine G₂
AFM1	Aflatoxine M₁
OTA	Ochratoxine A
FB1	Fumonisine B₁
FB2	Fumonisine B₂
FB3	Fumonisine B₃
T-2	Toxine T-2
HT-2	Toxine HT-2
DAS	Diacétoxyscirpénol
DON	Déoxynivalénol
NIV	Nivalénol
FX	Fusarenone X
3aDON	3 Acétyl-déoxynivalénol
15aDON	15 Acétyl-déoxynivalénol
ZEA	Zéaralénone
RAL	Acide résorcylique
SCOOP	Scientific Cooperation on Questions relating to Foods
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
CCM	Chromatographie sur Couche Mince

Liste des figures et des tableaux

Figure 1. Modes de formation des conidies	pag. 19
Figure 2. Modes de groupement des conidies	pag. 20
Figure 3. Classification des champignons	pag. 24
Figure 4. Principaux caractères morphologiques des <i>Aspergillus</i>	pag. 27
Figure 5. <i>Aspergillus flavus</i>	pag. 29
Figure 6. <i>Aspergillus fumigatus</i>	pag. 30
Figure 7. <i>Aspergillus niger</i>	pag. 31
Figure 8. <i>Aspergillus ochraceus</i>	pag. 31
Figure 9. <i>Aspergillus oryzae</i>	pag. 32
Figure 10. Caractères du thalle de genre <i>Penicillium</i>	pag. 36
Figure 11. Caractères morphologiques des <i>Penicillium</i>	pag. 36
Figure 12. Caractères morphologiques des <i>Fusarium</i>	pag. 40
Figure 13. <i>Fusarium culmorum</i>	pag. 41
Figure 14. <i>Fusarium graminearum</i>	pag. 42
Figure 15. <i>Fusarium oxysporum</i>	pag. 42
Figure 16. <i>Fusarium verticilloides</i>	pag. 43
Figure 17. Voies de biosynthèse des mycotoxines	pag. 65
Figure 18. L'ochratoxine A	pag. 71
Figure 19. Structure générale des fumonisines	pag. 75
Figure 20. Structure chimique générale des principaux trichothécènes de groupes A et B	pag. 79
Figure 21. Structure moléculaire de la zéaralénone	pag. 84
Figure 22. <i>Fusarium graminearum</i>	pag. 160
Figure 23 : niveau de production du DON après 5 semaines de culture sur riz, maïs et blé	pag. 161
Figure 24. Production de ZEA après 6 semaines de culture sur riz et maïs grossièrement broyé	pag. 162
Figure 25. Cinétique de la production de DON en fonction du temps et de la température de culture	pag. 163
Tableau 1. Principales mycotoxines et espèces fongiques productrices	pag. 13
Tableau 2. Les <i>Aspergillus</i> producteurs de mycotoxines	pag. 33
Tableau 3. Les <i>Penicillium</i> producteurs des mycotoxines	pag. 37
Tableau 4. Les <i>Fusarium</i> producteurs des mycotoxines	pag. 44
Tableau 5. Influence de pH sur la croissance de <i>Fusarium proliferatum</i>	pag. 46
Tableau 6. Présence des <i>Aspergillus</i> dans les céréales	pag. 50
Tableau 7. Présence des <i>Penicillium</i> dans les céréales	pag. 51
Tableau 8. Présence des <i>Fusarium</i> dans les céréales	pag. 52
Tableau 9. Présence de moisissures dans les aliments composés pour les animaux	pag. 54
Tableau 10. Présence de moisissures dans les produits alimentaires à base de céréales	pag. 56
Tableau 11. Présence des espèces fongiques toxigènes dans les légumes	pag. 57
Tableau 12. Présence des espèces fongiques toxigènes dans les produits laitiers	pag. 58
Tableau 13. Espèces fongiques présentes dans les produits carnés	pag. 60
Tableau 14. Influence de pH sur la production de fumonisine B1	pag. 62
Tableau 15. Influence de température sur l'élaboration de zéaralénone et déoxynivalénol par <i>Fusarium graminearum</i>	pag. 63
Tableau 16. Les principaux représentants de famille d'aflatoxines	pag. 67
Tableau 17. Présence des aflatoxines dans des matières premières et des produits d'origine végétale	pag. 68
Tableau 18. Présence de l'aflatoxine M ₁ dans le lait et les produits laitiers	pag. 69
Tableau 19. Présence de l'ochratoxine A dans céréales	pag. 72

Tableau 20. Présence de l'ochratoxine A dans des produits végétaux	pag. 73
Tableau 21. Les principales fumonisines	pag. 75
Tableau 22. Présence de fumonisines dans des céréales	pag. 76
Tableau 23. Présence de fumonisines dans des produits à base de céréales	pag. 77
Tableau 24. Présence de trichothécènes dans des céréales	pag. 81
Tableau 25. Présence de trichothécènes dans des produits à base de céréales	pag. 82
Tableau 26. Présence de zéaralénone dans les céréales	pag. 85

Résumé

Les moisissures sont des contaminants fréquents de nombreux substrats végétaux et de certains produits d'origine animale. Leur présence peut améliorer les qualités organoleptiques du produit ou, au contraire, l'altérer et conduire à l'accumulation de métabolites secondaires toxiques : les mycotoxines.

L'objectif de ce travail a été de caractériser la flore fongique de différents substrats (céréales et produits de salaison) et d'étudier le potentiel toxigène des souches isolées afin d'évaluer le risque mycotoxicologique associé à la consommation de ces aliments.

Nous avons aussi caractérisé les conditions optimales de production de certaines mycotoxines. L'objectif était double : les comparer avec les conditions naturelles et déterminer les paramètres nécessaires à la production de grandes quantités de toxines partiellement purifiées. Ce dernier point est un préalable nécessaire à l'étude de l'impact de ces contaminants sur la santé animale et la qualité des produits d'origine animale.

Summary

Moulds are common contaminants of a wide variety of vegetal and animal derived foods. Their presence can improve organoleptic properties or, contrary, lead to food spoilage and accumulation of toxic compounds: mycotoxins.

The aim of this study was to characterize the fungal flora of several substrates (cereals and dry cured meat products) and to determine the toxigenic potential of isolated strains in order to appreciate the risk associated with consumption of such food products.

We also characterized the optimal conditions for some mycotoxin production. The objectives were double: to compare them with natural conditions and to be able to produce large quantities of partially purified toxins. This later point is necessary to investigate effects of these contaminants on both animal health and quality of animal derived products

SOMMAIRE

	Pages
Introduction	12
Première partie : Données bibliographiques	15
<i>Les moisissures: conditions de développement et de toxinogénèse</i>	
1. Identification et classement des moisissures	16
1.1. Identification des moisissures	16
1.1.1. Identification morphologique	17
1.1.1.1. Critères d'identification macroscopique	17
1.1.1.2. Critères d'identification microscopique	18
1.1.2. Identification génétique	22
1.2. Classement des moisissures	23
1.3. Principaux genres fongiques	26
1.3.1. Le genre <i>Aspergillus</i>	26
1.3.1.1. Caractères cultureux généraux	28
1.3.1.2. Morphologie microscopique	28
1.3.1.3. Les principales espèces	29
1.3.1.4. Importance du genre <i>Aspergillus</i>	33
1.3.2. Le Genre <i>Penicillium</i>	35
1.3.2.1. Caractères cultureux généraux	35
1.3.2.2. Morphologie microscopique	36
1.3.2.3. Importance du genre <i>Penicillium</i>	37
1.3.3. Le genre <i>Fusarium</i>	38
1.3.3.1. Caractères cultureux généraux	39
1.3.3.2. Morphologie microscopique	39
1.3.3.3. Principales espèces de <i>Fusarium</i>	40
1.3.3.4. Importance du genre <i>Fusarium</i>	44

2. Contamination des aliments par les moisissures	45
2.1. Conditions de développement des moisissures	45
2.1.1. Activité en eau (Aw)	46
2.1.2. pH	46
2.1.3. Présence d'oxygène	47
2.1.4. Température	47
2.1.5. Lumière	48
2.1.6. Interactions microbiennes	48
2.1.7. Présence d'insectes	48
2.2. Contamination des aliments par les moisissures	49
2.2.1. Contamination de céréales et produits végétaux	50
2.2.1.1. Les céréales	50
2.2.1.2. Aliments composés pour les animaux	53
2.2.1.3. Produits alimentaires à base de céréales	55
2.2.1.4. Autres végétaux	56
2.2.1.5. Produits affinés d'origine animale	57
3. Les mycotoxines	61
3.1 Conditions de toxino-génèse	61
3.1.1. Activité en eau (Aw)	61
3.1.2. pH	61
3.1.3. Présence d'oxygène	62
3.1.4. Température	62
3.1.5. Composition du substrat	63
3.1.6. Interactions microbiennes	63
3.2. Nature et origine des mycotoxines	64
3.2.1. Biogénèse des mycotoxines	64
3.2.2. Structure des mycotoxines	65
3.3. Les principales mycotoxines	66
3.3.1. Les aflatoxines	66
3.3.1.1. Contamination des aliments	66
3.3.1.2. Effets toxiques d'aflatoxines	69
3.3.2. L'ochratoxine A	70
3.3.2.1. Contamination des aliments	71
3.3.2.2. Effets toxiques de l'ochratoxine	73
3.3.3. Les fumonisines	74
3.3.3.1. Contamination des aliments	75
3.3.3.2. Effets toxiques des fumonisines	77
3.3.4. Les trichothécènes	78

3.3.4.1. Contamination des aliments	80
3.3.4.2. Effets toxiques des trichothécènes	82
3.3.5. La zéaralénone	84
3.3.5.1. Contamination des aliments	85
3.3.5.2. Effets toxiques de zéaralénone	86
Objectifs de la thèse	87
Deuxième partie : Données expérimentales	88
<i>Analyse de la flore fongique de différents substrats</i>	
Article 1 : Contamination Fongique et mycotoxique de céréales produites dans le Sud Est de la Roumanie	89
Article 2 : Contamination fongique et mycotoxique du maïs vietnamien	112
Article 3 : Flore fongique des salaisons sèches commercialisées en France	136
Article 4 : Production et stabilité de la patuline, l'ochratoxine A, la citrinine et l'acide cyclopiazonique sur le jambon sec	146
<i>Détermination des conditions optimales de production du déoxynivalénol et de la zéaralénone</i>	155
Introduction	156
Matériel et méthodes	157
Résultats et discussion	160
Conclusions générales	165
Références bibliographiques	167

Introduction

Les moisissures représentent un groupe hétérogène de champignons microscopiques saprophytes et, parfois parasites, caractérisés par :

- la nature chimique de paroi cellulaire, riche en chitine ;
- la reproduction par spores sexuées ou asexuées ;
- la présence de glycogène, comme substance de réserve ;
- l'absence de la chlorophylle.

Ce sont des organismes eucaryotes, thallophytes car l'appareil végétatif est un thalle constitué par des filaments mycéliens à croissance apicale, dans toutes les directions à la même vitesse. Dépourvues de pigments assimilateurs, les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes dépendants d'une source de carbone organique. Globalement peu exigeants sur les conditions environnementales du substrat, ces champignons peuvent contaminer les milieux les plus divers comme : les céréales, les produits d'origine animale (lait, viande) mais aussi le papier, les tissus, les matières organiques en décomposition, où elles trouvent une source de carbone et d'azote accessible.

La contamination fongique d'un substrat ou d'un aliment provoque des modifications physiques (aspect, goût, odeur) et des modifications chimiques (modification des qualités nutritives). On peut distinguer deux grands types de moisissures :

Les moisissures utiles qui sont utilisées dans l'industrie pour conférer aux produits des propriétés organoleptiques et technologiques supérieures comme le *Penicillium camemberti* et *Penicillium roqueforti* en fromagerie, *Penicillium jensenii* ou *nalgiovense* en salaisonnerie.

Les moisissures nuisibles qui peuvent se développer sur différents substrats et entraîner une altération des qualités nutritionnelles et diététiques des produits. Ainsi, on estime que le développement incontrôlé de micromycètes est à l'origine de la perte de 5 à 10% des récoltes mondiales (Filtenborg *et al.*, 1996).

Par ailleurs, dans des conditions propices de température, humidité, pH, composition de substrat, les moisissures peuvent synthétiser des métabolites secondaires toxiques : les mycotoxines.

Parmi la centaine de mycotoxines identifiées à l'heure actuelle, une trentaine sont véritablement importantes pour la santé humaine et animale à cause de leur fréquence ou de leur toxicité (Bennett et Klich, 2003). Les toxines majeures (Tableau 1) sont produites par des souches fongiques appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (AFSSA, 2006).

Tableau 1 : Principales mycotoxines et espèces fongiques productrices.

Mycotoxines	Principales moisissures productrices
<i>Mycotoxines réglementées ou en cours de réglementation</i>	
Aflatoxines B1, B2, G1, G2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>
Ochratoxine A	<i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i>
Patuline	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> <i>Byssoschlamys nivea</i>
Fumonisines B1, B2, B3	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>
Trichothécènes (DON)	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. acuminatum</i>
Zéaralène	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> .
Alcaloïdes d'ergot (dit ergot du seigle)	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>C. paspali</i> , <i>C. africana</i>
<i>Autres mycotoxines</i>	
Citrinine	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>A. carneus</i> , <i>A. niveus</i> <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i>
Toxines d' <i>Alternaria</i> (alternariol, alternariol méthyl éther...)	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria solani</i>
Acide cyclopiazonique	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. tamarii</i> <i>Penicillium</i> dont <i>P. camemberti</i>
Stérigmatocystine	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. flavus</i>
Sporidesmines	<i>Pithomyces chartarum</i>
Stachybotryotoxines	<i>Stachybotrys chartarum</i>
Toxines d'endophytes (ergovaline, lolitrem B)	<i>Neotyphodium coenophialum</i> , <i>N. lolii</i>
Phomopsines	<i>Phomopsis leptostromiformis</i>
Toxines trémorgènes	<i>Penicillium roquefortii</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. puberulum</i> <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>A. fumigatus</i>

Toutefois, il n'existe pas de relation directe entre espèce fongique et mycotoxine. En effet, une molécule peut-être produite par plusieurs espèces fongiques et, au sein d'une espèce

toxigène, toutes les souches n'ont pas forcément la capacité à produire la (les) mycotoxine(s) (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002). Par conséquent, l'évaluation du risque lié à la contamination fongique des aliments de l'homme et des animaux nécessite, d'une part d'identifier les espèces susceptibles de contaminer ce substrat et de déterminer si, dans les conditions de préparation, les conditions environnementales peuvent entraîner la synthèse et l'accumulation de toxines dans l'aliment. Ces travaux sont un préalable nécessaire à l'établissement de plans de contrôles mycotoxiques pertinents, prenant en considération les particularités des différents aliments.

L'objectif de ce travail a donc été de caractériser la flore fongique de différents types d'aliments d'origine végétale et animale, de caractériser le potentiel toxigène des souches fongiques isolées et de caractériser les conditions optimales de production de certaines mycotoxines.

1^{ère} partie

Données Bibliographiques

Les moisissures :

conditions de développement et de toxinogénèse

1- Identification et classement des moisissures

Les champignons, ou les mycètes, sont des organismes eucaryotes uni- ou pluricellulaires, incluant des espèces macroscopiques (macromycètes) et d'autres microscopiques (micromycètes) d'aspect filamenteux ou lévuriforme. Ces derniers peuvent devenir visibles lorsque leur développement est important. Ces champignons sont appelés couramment « moisissures », véritables agglomérats de filaments mycéliens et d'organes fructifères capables de coloniser des substrats très divers (végétaux, papier, cuir, murs....). Il s'agit d'organismes hétérotrophes (nécessitant une source de carbone et d'azote pour leur développement) et ubiquistes.

Une caractéristique majeure des champignons est leur mode de reproduction ; ils produisent un grand nombre de spores, ce qui leur assure un pouvoir de contamination considérable. Les spores sont issues de plusieurs modalités de reproduction sexuée ou asexuée qui représentent le principal critère de leur classification.

1.1- Identification des moisissures

L'identification des très nombreuses espèces fongiques susceptibles de coloniser les aliments et d'en altérer les qualités, voire de produire des mycotoxines est une étape indispensable à l'évaluation du risque mycotoxique.

Cette identification a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques de l'espèce. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification. Toutefois, la complexité du règne fongique fait, qu'à l'heure actuelle, ces outils ne peuvent pas encore remplacer complètement l'examen morphologique, qui reste la base de l'identification.

1.1.1- Identification morphologique

L'identification d'une espèce fongique repose sur l'analyse de critères culturels (température et vitesse de croissance, milieux favorables) et morphologiques. Ces derniers sont constitués des paramètres macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers) et microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,...) (Cahagnier et Richard-Molard, 1998).

1.1.1.1- Critères d'identification macroscopique

L'aspect des colonies représente un critère d'identification. Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses ; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (l'absence ou pauvreté du mycélium aérien).

Le relief des colonies : il peut être plat ou plissé et la consistance des colonies peut être variable (molle, friable, élastique ou dure).

La taille des colonies: Elle peut-être très variable en fonction des genres fongiques : petites colonies (*Cladosporium*) ou au contraire, colonies étendues, envahissantes (*Mucor*, *Rhizopus*).

La couleur des colonies est un élément très important d'identification ; les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le rouge allant jusqu'au violet ou le bleue, le vert, le brun allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*).

Les structures de fructification : la présence ou l'absence, au centre de la colonie, des structures de fructification sexuée (cléistothèces) ou asexuée (pycnides) est aussi un élément important de diagnose (Botton *et al.*, 1990).

1.1.1.2- Critères d'identification microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle et coloration de la préparation au Bleu Cotton. Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants de diagnose (Cahagnier et Richard-Mollard, 1998).

Le thalle : tous les champignons possèdent un appareil végétatif constitué de filaments (hyphes) qui, ensemble, forment le thalle filamenteux ou le mycélium ; le thalle peut être siphonné ou septé :

- Le thalle siphonné, constitué d'éléments tubulaires peu ou pas ramifié, de diamètre large et irrégulier (5-15 µm), non cloisonné est caractéristique des *Zygomycètes* ;
- Le thalle septé ou cloisonné, constitué de filaments de diamètre étroit (2-5 µm) et régulier, divisé par des cloisons en articles uni ou pluricellulaires est caractéristique des *Ascomycètes*, *Basidiomycètes* et *Deutéromycètes* (Badillet *et al.*, 1987).

Les spores

Les spores qui sont le produit de la reproduction asexuée peuvent être endogènes ou exogènes :

- Les spores endogènes (endospores) sont produites à l'intérieur d'un sac fermé (sporange), porté par un filament spécialisé (sporangioaphore). Ces spores, que l'on observe par exemple chez les *Mucorales*, sont libérées par le déchirement de la paroi de sporange à maturité.
- Les spores exogènes (conidies), retrouvées chez les *Ascomycètes*, *Basidiomycètes* et *Deutéromycètes*, sont formées par bourgeonnement à partir d'une cellule spécialisée (cellule conidiogène).

L'examen des spores et de leur organisation est une étape importante de l'identification fongique (Campbell *et al.*, 1996).

Aspect des spores

D'après la forme et les modalités de septation, on distingue 5 groupes de spores

- 1) les amérospores : spores unicellulaires de petite taille (*Penicillium*, *Aspergillus*)
- 2) les didymospores : spores bicellulaires (*Trichothecium*) ;

- 3) les phragmospores : spores pluricellulaires à cloisons transversales (*Curvularia*) ;
- 4) les dictyospores : spores pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales (*Alternaria*) ;
- 5) les scolécospores : spores étroites, effilées, souvent incurvées et cloisonnées transversalement (*Fusarium*).

Modes de formation des conidies

Le mode thallic : la formation des spores s'effectue à partir d'éléments préexistants du thalle. On en distingue deux variantes principales :

- le type thallic solitaire, ex: *Chrysosporium*
- le type thallic arthrique, ex: *Geotrichum*

Le mode blastique : les spores sont formées par bourgeonnement à partir de cellules conidiogènes différenciées ou pas, puis une cloison se forme à l'émergence de bourgeon et la cellule fille (la spore) se sépare de la cellule mère. On en distingue plusieurs variantes :

- le type blastique acropète, ex: *Cladosporium*, *Alternaria*
- le type blastique synchrone, ex: *Botrytis*
- le type blastique sympodial, ex: *Beauveria*

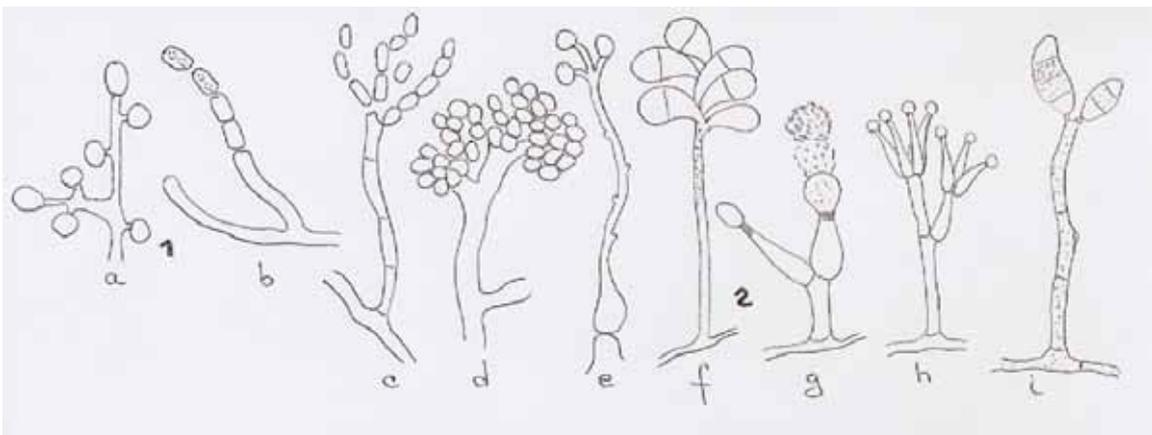


Figure 1. Modes de formation des conidies

1. Formation thallic : a : solitaire (*Chrysogenum*), b : arthrique (*Geotrichum*)
2. Formation blastique : c : acropète (*Cladosporium*), d : synchrone (*Botrytis*), e : sympodial (*Beauveria*), f : régressif (*Trichothecium*), g : annelidique (*Scopulariopsis*), h : phialidique (*Penicillium*), i : poric (*Curvularia*).

- le type blastique régressif, ex: *Trichothecium*
- le type blastique percurrent (annellidique), ex : *Scopulariopsis*
- le type blastique phialidique, ex: *Aspergillus*, *Penicillium*
- le type blastique porique, ex: *Alternaria*, *Curvularia* (Figure 1) (Botton *et al.*, 1990).

Mode de groupement des conidies

Les conidies sont, en général, regroupées à l'extrémité de la cellule conidiogène. L'organisation de ce regroupement est aussi un facteur d'identification. Les principaux types sont :

- grappes, ex. *Beauveria*, *Trichothecium*
- masse, ex. *Botrytis*
- têtes ou balles, ex. *Acremonium*, *Trichoderma*
- chaînes basipètes, ex. *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, *Penicillium*
- chaînes acropètes, ex. *Cladosporium*, *Alternaria* (Figure 2) (Botton *et al.*, 1990).

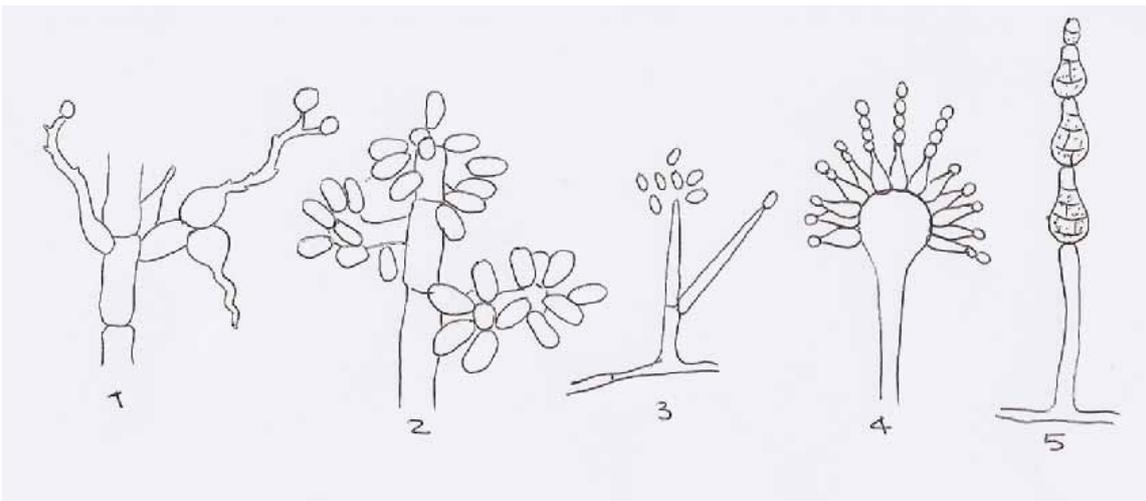


Figure 2. Modes de groupement des conidies des champignons filamenteux

1. grappes (*Beauveria*), 2. masses (*Botrytis*), 3. têtes (*Acremonium*),
4. chaînes basipètes (*Aspergillus*), 5. chaînes acropètes (*Alternaria*).

Mode d'implantation des cellules conidiogènes

Les cellules conidiogènes peuvent naître de structures plus ou moins élaborées issues du mycélium végétatif. Ceci est utilisé pour l'identification de genres et d'espèces (de Hoog et Guarro, 1995).

Les cellules conidiogènes non différenciées sont intégrées dans les hyphes, intercalaires ou situées dans une position terminale (ex : *Aureobasidium*).

Les cellules conidiogènes sont différenciées. Elles peuvent alors être :

- directement insérées sur les filaments végétatifs (ex : *Acremonium*, *Fusarium*) ;
- bien distinctes des filaments végétatifs, portées par des conidiophores dispersés sur le thalle végétatif :
 - a) regroupées à l'extrémité dilatée du conidiophore, formant une tête (ex : *Aspergillus*) ;
 - b) regroupées en verticille au sommet du conidiophore, formant un pinceau (ex : *Penicillium*) ;
 - c) disposées en verticille le long du conidiophore (ex : *Verticillium*) ;
- bien distinctes des filaments végétatifs, portées par des conidiophores groupés :
- conidiophores disposés parallèlement les uns aux autres, agrégés en une gerbe sporifère nommée corèmie (ex : *Graphium*) ;
- conidiophores agrégés en coussinets superficiels nommé sporodochie (ex : *Myrothecium*).

Présence de structures protectrices issues de la reproduction asexuée ou sexuée

Les structures protectrices issues de la reproduction asexuée sont les pycnides et les acervules :

- Les pycnides sont des nodules mycéliens, creux, composés d'une paroi épaisse formée par un feutrage compact de filaments mycéliens. La face interne de la paroi est tapissée des conidiophores produisant des conidies qui sont libérées à maturité par l'ostiole (*Phoma*).

- Les acervules sont des agrégats de filaments mycéliens enchevêtrés, solidement attachés sur un végétal délimitant une cavité avec une ouverture. A l'intérieur, on retrouve une assise de conidiophores produisant les conidies.

Sur les milieux de culture seules les pycnides sont visibles, les acervules ne se formant que dans les tissus de l'hôte végétal (de Hoog et Guarro, 1995).

Les structures protectrices issues de la reproduction sexuée peuvent être observées chez les Ascomycètes ; l'ascocarpe, qui protège l'asque peut être de plusieurs types:

- a) *les apothécies* : l'ascocarpe est ouvert, en forme de coupe, portant les asques en surface ;

- b) *les cléistothèques* : l'ascocarpe est arrondi et lisse ; il n'y a pas de réseaux mycéliens périphériques ; il est clos et sa paroi se fissure à maturité pour libérer les asques sphériques octosporées (ex : *Emericella*) ;
- c) *les périthèces* : l'ascocarpe à la forme d'une bouteille avec, à l'extrémité rétrécie, une ouverture (ostiole) ; le périthèce renferme des asques allongés, entourés d'une paroi à simple membrane (unitunique) ou à deux membranes (bitunique) et contenant chacun 8 ascospores (*Chaetomium*) ;

Présence des chlamydospores

Les chlamydospores sont des éléments de résistance qui sont formés à partir du filament mycélien ou à son extrémité. Elles ont une paroi épaisse. Contrairement aux autres spores, les chlamydospores ne possèdent pas de mécanismes de libération permettant leur dissémination à maturité. Bien que peu spécifiques puisqu'elles se retrouvent pratiquement chez toutes les espèces lorsque les conditions sont défavorables, elles peuvent cependant constituer une aide dans l'identification lorsqu'elles apparaissent précocement (comme chez certaines espèces de *Fusarium*).

1.1.2- Identification génétique

L'identification d'espèces fongiques est traditionnellement fondée sur les caractéristiques culturales et morphologiques macroscopiques et microscopiques. Cette identification nécessite donc, en général, plusieurs jours de culture (7 à 10 jours le plus souvent). La culture sur des milieux spécifiques peut être nécessaire pour obtenir la formation de conidies et, dans certains cas, l'absence d'apparition de conidies rendra impossible l'identification du mycélium. Par conséquent, de nombreuses études ont visé à développer des méthodes **outils** d'identification reposant sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN) et ne nécessitant plus obligatoirement un examen morphologique (Peterson, 2006 ; Hinrikson *et al.*, 2005 ; Feuilhade de Chauvin, 2005 ; Jin *et al.*, 2004 ; Reiss *et al.*, 1998).

Les méthodes les plus intéressantes sont basées sur l'amplification par PCR (polymerase chain reaction) de certaines régions spécifiques comme le gène codant pour la sous-unité 28S ribosomale (région D1-D2) et des régions ITS1 et ITS2 (Hinrikson *et al.*, 2005).

L'identification moléculaire d'espèces fongiques est, à l'heure actuelle, surtout appliquée en mycologie médicale pour différencier les espèces d'intérêt. En effet, les infections fongiques envahissantes sont de plus en plus identifiées comme cause primaire de morbidité et de

mortalité, particulièrement chez les immunodéficients (de Aguire, *et al.*, 2004). L'identification moléculaire peut permettre une différenciation rapide des différentes espèces d'*Aspergillus* ainsi que celle d'autres moisissures ou levures, pathogènes opportunistes (Dial, 2007 ; de Aguire, *et al.*, 2004 ; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2007 ; Paterson *et al.*, 2003). Les sondes d'oligonucléotide, dirigées vers la région ITS 2 de l'ADN ribosomal de l'*Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. ustus*, et *A. versicolor* ont permis la différenciation de 41 isolats et n'ont donné aucune réaction faussement positive avec 33 espèces d'*Acremonium*, *Exophiala*, *Candida*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, ou d'autres espèces d'*Aspergillus* (de Aguire, *et al.*, 2005).

Cette méthode est aussi utilisée pour différencier et identifier les moisissures responsables de l'altération des aliments, principalement les espèces de *Penicillium* (Boysen *et al.*, 2000 ; Hageskal *et al.*, 2006).

En ce qui concerne les *Fusarium*, les méthodes moléculaires existantes donnent des résultats fréquemment peu concluants et l'examen morphologique classique semble encore une méthode indispensable à l'identification des espèces appartenant à ce genre fongique (Healy *et al.*, 2005).

De nombreux travaux visent aussi à utiliser les progrès de la biologie moléculaire afin de dépister rapidement les souches fongiques toxigènes (pour revue : Niessen, 2007).

Si à l'heure actuelle les outils de d'identification moléculaire ne semblent pas en mesure de remplacer l'identification morphologique classique, il est probable que dans les années à venir, ces méthodes représenteront des outils particulièrement utiles pour la détection et l'identification fongique dans les aliments.

1.2- Classement des moisissures

L'ensemble des caractéristiques morphologiques évoquées précédemment a permis le classement des moisissures. Il s'agit d'un véritable règne comprenant des divisions, elles-mêmes subdivisées en classes ; les classes englobent des ordres qui rassemblent des familles ; une famille peut comprendre un ou plusieurs genres et le genre, à son tour, rassemble une ou plusieurs espèces. Chaque champignon porte un nom qui suit les règles de la nomenclature binominale (genre et espèce) énoncées au XVIII^{ème} siècle par Carl von Linné.

La classification de Kwon Chung et Bennett (1992) modifiée par de Hoog et Guarro (1995) est la plus utilisée actuellement (Figure 3). On estime à plus de 100 000 le nombre d'espèces

fongiques, plus de 1000 d'entre elles pouvant contaminer les aliments (Castegnaro et Pfohl-Leskowicz, 2002).

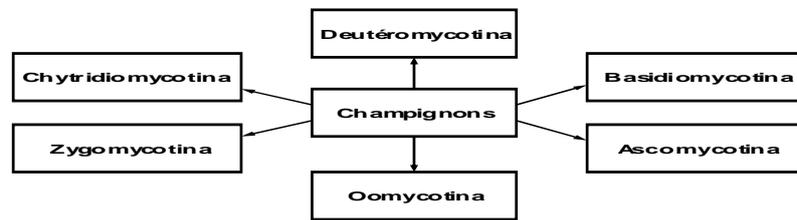


Figure 3. Classification des champignons.

Les Ascomycètes

Ce groupe comprend un grand nombre d'espèces pathogènes pour l'homme et les animaux (levures ascospérées ou champignons filamenteux comme les *Aspergillus*). L'appareil végétatif est un thalle à mycélium septé.

Les *Ascomycètes* présentent une structure caractéristique appelée asque, formé au cours de la reproduction sexuée, qui renferme un nombre défini d'ascospores. Ce sporocyste, globuleux, cylindrique ou plus ou moins claviforme, avec une paroi simple ou double représente un important critère d'identification.

Les ascospores, hyalines ou colorées, globuleuses, elliptiques, cylindriques, vermiculaires, unicellulaires, cloisonnées transversalement ou cloisonnées transversalement et longitudinalement, lisses ou ornementées sont utilisées aussi pour l'identification des genres et des espèces.

Souvent les asques sont produits, en grand nombre, dans des structures de fructification, nommés ascocarpes, divisés en 3 catégories : les cléistothèques (ascocarpes globuleux, clos, rencontrés chez *Eurotium* et *Emericella*), les périthèces (ascocarpes plus ou moins en forme de bouteille présentant un ostiole par lequel les spores sont expulsées, rencontré chez *Chaetomium*) et les apothécies (ascocarpes ouverts, en forme de coupe, portant des asques en surface). Certains *Ascomycètes* présentent des asques nus (levures) ou enveloppés dans un feutrage mycélien lâche (*Byssochlamys*).

A côté de cette forme sexuée, ascogène (forme parfaite ou téléomorphe), la majorité d'*Ascomycètes* se reproduisent par multiplication asexuée (forme imparfaite ou anamorphe) à l'aide des conidies ((Botton *et al.*, 1990 ; Sutton *et al.*, 1998).

Les *Ascomycètes* ont une grande importance économique. Certaines espèces sont des agents de biodégradation des substrats celluloses. Les *Ascomycètes* sont souvent retrouvés comme des parasites redoutables de végétaux (l'ergot du seigle parasité par *Claviceps purpurea*) ou de l'homme (histoplasmosse). Certaines espèces peuvent entraîner des altérations aux denrées alimentaires et élaborer des toxines ; d'autres interviennent dans des processus de fermentations des industries agro-alimentaires.

Les Deutéromycètes (Champignons imparfaits ou *Fungi imperfecti*)

Les *Deutéromycètes* réunissent le plus grand nombre d'espèces pathogènes pour l'homme et les animaux. Cette division, très hétérogène, englobe toutes les espèces de champignons, pour lesquelles la reproduction sexuée n'est pas connue. La majorité de *Deutéromycètes* sont des formes imparfaites d'*Ascomycètes*.

Ces champignons sont unicellulaires ou à thalle filamenteux septé. Les *Deutéromycètes* sont divisés en 3 classes :

- les *Blastomycètes* qui réunissent des levures ;
- les *Hyphomycètes* : champignons filamenteux, stériles ou produisant des spores directement sur les hyphes ou sur des conidiophores simples ou agrégés (*Moniliales*) ;
- les *Coelomycètes* : Champignons auxquelles les conidies sont produites dans des structures de protection : les pycnides (*Sphaeropsidales*) et les acervules (*Mélanconiales*) ;

Les *Hyphomycètes* et les *Coelomycètes* comprennent des agents de biodégradation mais aussi des moisissures utiles aux biotechnologies.

Les *Hyphomycètes* sont des champignons pour lesquels les conidies naissent de cellules banales ou de cellules spécialisées souvent portées par un filament différencié, le conidiophore. Certaines hyphomycètes (*Rhizoctonia*, *Sclerotium*) ne forment jamais de spores ; ils sont classés dans le groupe *Micellia sterilia*.

Les spores peuvent être :

- a) des chlamydospores, spores de résistance, souvent à paroi épaisse, terminales ou intercalaires, différenciées par transformation de cellules du mycélium (*Trichoderma*, *Fusarium*) ou de conidies (*Fusarium*) ;
- b) des arthrospores (arthroconidies) formées par fragmentation d'hyphes non différenciées.

- c) des conidies proprement dites, souvent bourgeonnées par des cellules spécialisées nommées phialides.

La forme, les dimensions, la couleur, la structure (unicellulaires, bicellulaires, ...), l'ornementation des conidies représentent un ensemble de caractères très varié qui constitue des critères d'identification de genres et d'espèces.

Les cellules conidiogènes ou les phialides bourgeonnent à l'apex des spores en succession basipétales réunies en glomérules (*Phialophora*, *Stachybotrys*) ou en chaînes (*Aspergillus*, *Penicillium*). Les cellules conidiogènes sont diverses comme forme (ampulliformes, ovées, lancéolées, subulées, ...), solitaires ou groupées en verticille (*Trichoderma*) ou en têtes (*Aspergillus*, *Penicillium*).

Les sclérotés, présents sous la forme de masses mycéliennes compactes, souvent dures, globuleuses, ellipsoïdales ou allongées, sont considérés comme des organes de conservation (*Botrytis*, *Aspergillus*, *Penicillium*).

Les *Coelomycètes* sont des champignons auxquels les cellules conidiogènes sont renfermées dans des structures de fructification dont la morphologie permet de différencier :

- a) Les *Sphaeropsidales*, pour lesquelles les cellules conidiogènes sont dans des organes globuleux ou en forme de bouteille, appelés pycnides (*Phoma*) ;
- b) Les *Melanconiales*, généralement parasites de végétaux, forment des structures de fructification aplaties (acervules), sous l'épiderme ou la cuticule des cellules de la plante-hôte (Botton *et al.*, 1990 ; Sutton *et al.*, 1998).

1.3- Principaux genres fongiques

Les genres les plus importants de point de vue économique et médical sont les *Aspergillus*, les *Penicillium* et les *Fusarium* qui représentent les contaminants les plus fréquents des aliments. On les retrouve principalement dans les céréales, mais aussi dans de nombreux autres produits végétaux et d'origine animale.

1.3.1- Le genre *Aspergillus*

C'est un genre appartenant à la classe des *Ascomycètes*. Le thalle, hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (Figure 4) (Raper et Fennell, 1965).

Ce genre comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches (Raper et Fennell, 1965 ; Botton *et al.*, 1990 ; Roquebert, 1998). Une vingtaine d'espèces est impliquée dans des pathologies animales et humaines.

Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002); ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les céréales. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air (Morin, 1994).

Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'homme et les animaux en étant capable d'envahir les tissus vivants et provoquer des aspergilloses (*Aspergillus fumigatus* responsable de mycoses pulmonaires ; *Aspergillus niger* responsable d'aspergillose du conduit auditif) (Morin, 1994).

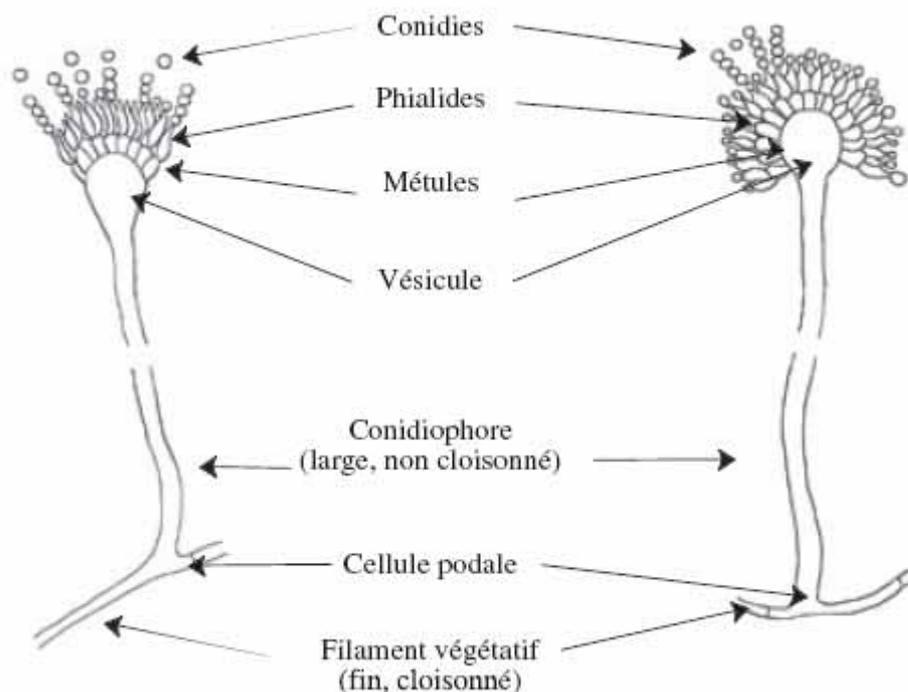


Figure 4. Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus*.

De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont aussi connues pour leur capacité à produire des mycotoxines responsables de pathologies animales et humaines.

Enfin, certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes, d'acides organiques (Botton *et al.*, 1990).

1.3.1.1- Caractères cultureux généraux

Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques (gélose au malt, Sabouraud) additionnés d'antibiotiques. Après 48 heures d'incubation, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens, blancs ; après 96 heures d'incubation, les colonies vont prendre leur teinte caractéristique, brune, verte, jaune ou noire selon les espèces. La majorité des *Aspergillus* poussent à 22-25°C ; les espèces thermophiles (*A. fumigatus*) se développent à 37-40°C est parfois jusqu'à 57°C (Badillet *et al.*, 1987 ; Morin, 1994).

Les *Aspergillus* forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses. La couleur de colonies permet une orientation rapide dans l'identification d'espèces : 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*. Le revers de la colonie est incolore ou jaune, mais il peut brunir ou rougir avec l'âge (Chermette et Bussieras, 1993).

1.3.1.2- Morphologie microscopique

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un appareil végétatif (thalle) formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés (conidiophores) qui se terminent par une vésicule de forme variable sur la quelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées) ou portées par des petits structures insérés sur la vésicule (têtes bisériées) nommées métules ou stérigmates (Figure 4) (Badillet *et al.*, 1987 ; Raper et Fennell, 1965). Les conidies, sèches, disposées en chaînes divergentes ou associées en colonnes compactes, sont toujours unicellulaires, globuleuses, sub-globuleuses ou elliptiques, lisses ou ornementées, hyalines ou pigmentées en jaune, vert, brun ou noir.

L'ensemble *vesicule* ± *métules* + *phialides* + *conidies* constitue la tête aspergillaire caractéristique du genre *Aspergillus*.

Pour certaines espèces, des formations sexuées apparaissent parfois en culture. Il s'agit de cléistotèques qui contiennent des asques arrondis renfermant chacun 8 ascospores.

Les « hülle cells » ou les cellules en noisette, sont des formations arrondies, réfringentes à paroi épaisse qui accompagnent souvent les formes sexuées, mais que l'on peut également observer isolément, indépendamment de la reproduction sexuée.

1.3.1.3- Les principales espèces

i) *Aspergillus flavus* :

Caractères cultureux : Le champignon se développe rapidement sur les milieux classiques (géloses au malt et Sabouraud) à 22-25°C. La température optimale de croissance est 37°C.

Sur le milieu de culture *A. flavus* forme des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaune, puis vert-jaune. Le revers peut être incolore, rosâtre ou brun-rouge foncé pour les souches productrices de sclérotés (Figure 5).

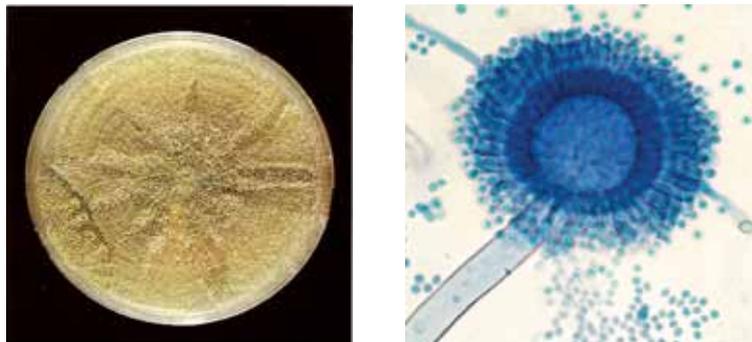


Figure 5. *Aspergillus flavus*
(culture de 7 jours sur gélose au malt à 25°C et aspect microscopique).

Morphologie microscopique : Les têtes conidiennes, unisériées ou bisériées, d'abord radiées, puis réparties en plusieurs colonnes de spores mal individualisées, jaunâtres au début, puis vert-jaune foncé. Les conidiophores hyalins, verruqueux, atteignent 1 à 2,5 mm de long. Les vésicules sont sub-globuleuses, et mesurent 25 (10-65) à 45 µm de diamètre. Les phialides (6-10 x 4-5,5 µm) sont insérées directement sur la vésicule (unisériées) ou portées par des métules. Les conidies sont globuleuses à sub-globuleuses, de 3-6 µm de diamètre, de couleur verte pâle, verruqueuses. Les sclérotés, fréquents dans les isolats récents, sont globuleux à sub-globuleux, d'abord blanc puis virant au brun-rouge foncé et au noir (Figure 5).

ii) *Aspergillus fumigatus* :

Caractères cultureux : mycélium à croissance rapide sur les milieux de culture classiques à 37°C. *A. fumigatus* est une espèce thermotolérante dont la température de croissance est comprise entre 15 et 48°C ; la température optimale étant située aux alentours de 40 et 42°C. Cette espèce peut se développer jusqu'à 57°C (Morin, 1994).

A. fumigatus forme des colonies d'abord blanches, puis bleu-vertes et enfin vert foncé à gris noirâtre. Le revers peut être incolore, jaune, vert ou brun-rouge suivant les souches.



Figure 6. *Aspergillus fumigatus*
(culture de 7 jours sur gélose au malt à 25°C et aspect microscopique).

Morphologie microscopique : Les têtes conidiennes, strictement unisériées, en colonne compacte sont d'abord bleu-vert puis virant au vert bronze. Les conidiophores sont courts (300-500 µm), lisses, s'élargissent insensiblement au sommet en formant des vésicules sub-hémisphériques. Ces dernières (20-30 µm en diamètre), vertes, sont fertiles dans leur moitié supérieure. Les phialides dressées, sont densément groupées, de couleur verte. Les conidies sont globuleuses à sub-globuleuses, mesurent 2(2,5)-3 (3,5) µm de diamètre, et sont échinulées (Figure 6).

iii) *Aspergillus niger* :

Caractères cultureux : Ce champignon pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques (gélouses au malt et Sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C, mais *A. niger* peut se développer jusqu'à 42°C.

Les colonies d'*A. niger* sont granuleuses, blanches au début, puis jaunes et, à maturité, elles deviennent noires. Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle. Sur le milieu Czapek, *A. niger* forme des colonies à mycélium blanc ou jaune, et revers souvent incolore (Figure 7).

Morphologie microscopique : Les têtes conidiennes, bisériées, radiées, sont disposées en plusieurs colonnes brunâtres ou noires. Les conidiophores sont longs atteignant 1,5-3 mm, lisses, hyalins ou brunâtres dans leur moitié supérieure. Les vésicules sont globuleuses et entièrement fertiles. Les phialides (7-10 x 3-3,5 µm) sont portées par des métules brunâtres, de dimensions variables. Les conidies sont habituellement globuleuses, parfois légèrement aplaties. Elles mesurent 3,5-5 µm de diamètre, sont brunes, échinulées à très verruqueuses. Les sclérotes parfois différenciés, sont crème à chamois foncé au début, puis virent au chamois vinacé (Figure 7).



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

iv) Aspergillus ochraceus :

Caractères cultureux : Ce champignon pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques à une température de 25 à 30°C.

Les colonies d'*A. ochraceus* sont poudreuses ou granuleuses, blanches au début, puis jaunes ou ocre-jaunes à chamois. Le revers de colonies est incolore au jaune pâle (Figure 8).



Figure 8. *Aspergillus ochraceus*
(aspect microscopique).

Morphologie microscopique : Les têtes conidiennes sont bisériées, d'abord globuleuses puis se séparent en 2 ou 3 colonnes divergentes, bien individualisées, de couleur jaune, ocre-jaune ou chamois. Les conidiophores sont rugueux, jaunes à brun pâle, longs atteignant 1,5 mm. Les vésicules sont globuleuses, hyalines, 30-50 μm en diamètre. Les phialides (7-10 x 2-3,5 μm) sont portées par des métules, de dimensions variables. Les conidies sont sub-globuleuses à globuleuses. Elles mesurent 2,5-3 (3,5) μm de diamètre, sont finement échinulées ou lisses. Les sclérotés, souvent présents, de couleur lavande à pourpre, sont globuleux, ovales ou cylindriques, et atteignent 1mm de diamètre (Figure 8).

v) *Aspergillus oryzae* :

Caractères culturels : Le champignon se développe rapidement sur les milieux classiques (géloses au malt et Sabouraud) à 22-25°C.

Sur milieu de culture *A. oryzae* forme des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord de couleur blanche, puis jaune, et enfin vert-jaunâtre à vert olive. Le revers peut être incolore ou jaunâtre (Figure 9).

Morphologie microscopique : *A. oryzae* peut souvent être confondu avec *A. flavus*. Les têtes unisériées ou bisériées (les deux aspects pouvant cohabiter sur une même souche), sont

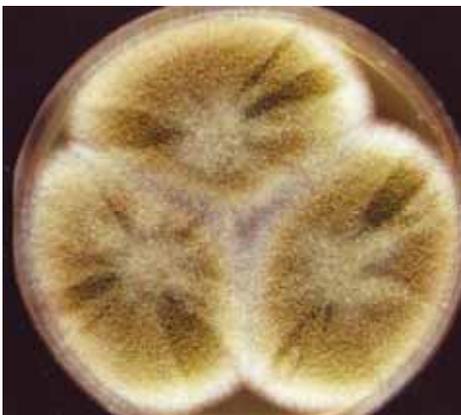


Figure 9. *Aspergillus oryzae*
(culture de 7 jours sur gélose au malt à 25°C).

radiées, jaunâtre au début puis jaune verdâtre à vert-olive, puis évoluent vers des tons bruns. Les conidiophores, hyalins, sont souvent longs (2,5-5 mm), plus ou moins verruqueux suivant les souches. Les vésicules sont sub-globuleuses, à paroi mince, mesurent 40-75 μm de diamètre. Les phialides (8-15 x 3-5 μm) sont insérées directement sur la vésicule ou portées par des métules. Les conidies d'abord piriformes à elliptiques deviennent sub-globuleuses à globuleuses, de taille très variable, lisses ou finement verruqueuses (Figure 9).

1.3.1.4- Importance du genre *Aspergillus*

i) Potentiel toxigène

De nombreuses espèces appartenant au genre *Aspergillus* (Tableau 2) sont connues pour leur capacité à produire certaines mycotoxines (Pitt, 2000).

Aspergillus flavus et *A. parasiticus* sont les principaux producteurs d'aflatoxines. L'aflatoxine B1 est classée comme cancérigène chez l'homme et l'animal (IARC, 1993).

Aspergillus fumigatus synthétise plusieurs métabolites très toxiques comme la fumagiline, l'acide helvolique, la gliotoxine, les dérivés quinoniques, des alcaloïdes voisins de ceux de l'ergot de seigle.

Aspergillus niger peut produire de l'acide oxalique, des malformines et, certaines souches, des aflatoxines.

Aspergillus ochraceus est le principal producteur d'ochratoxine A. Il colonise lui aussi de très nombreux substrats.

Aspergillus terreus élabore des substances antibactériennes, de toxicité variable (flavipine, terréine, citrinine, erdine et molécules voisines, clavacine) (Botton *et al.*, 1990).

Tableau 2 : Les *Aspergillus* producteurs de mycotoxines.

Espèces d' <i>Aspergillus</i>	Mycotoxines produites
<i>Aspergillus candidus</i>	candiduline
<i>Aspergillus carneus</i>	citrinine
<i>Aspergillus clavatus</i>	acide kojique, patuline, xanthociline
<i>Aspergillus flavus</i>	aflatoxines B1 et B2, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, acide kojique
<i>Aspergillus fumigatus</i>	fumigaclavine, fumagiline, fumitoxine, fumitremorgine A et C, gliotoxine
<i>Aspergillus niger</i>	malformine, naftoquinone
<i>Aspergillus nomius</i>	aflatoxines B1 et B2, G1 et G2, acide aspergillique
<i>Aspergillus oachraceus</i>	acide kojique, acide neoaspergillique, ochratoxine, acide penicillique, acide sécalonique A
<i>Aspergillus oryzae</i>	acide cyclopiazonique, acide kojique
<i>Aspergillus parasiticus</i>	aflatoxines B1 et B2, G1 et G2, acide aspergillique, acide kojique
<i>Aspergillus sydowii</i>	sterigmatocystine, griséofulvine
<i>Aspergillus terreus</i>	citréoviridine, citrinine, gliotoxine, patuline, terréine, acide terréique, terrétonine, territrem, terramide A
<i>Aspergillus verzicolor</i>	stérigmatocystine
<i>Aspergillus wentii</i>	acide kojique

ii) Pouvoir pathogène

Certaines espèces d'*Aspergillus* sont des pathogènes opportunistes ; leur développement nécessite des conditions locales favorables (cavernes tuberculeuses, cancer broncho-pulmonaire, broncho-pneumopathies chroniques obstructives, emphyèmes, mucoviscidose...) ou générales (corticothérapies prolongées, hémopathies malignes, chimiothérapies aplaisantes, SIDA...). (Badillet *et al.*, 1987 ; Morin, 1994)

Les principales espèces responsables de mycoses (aspergilloses) sont :

- *Aspergillus fumigatus* considéré comme le principal agent d'aspergillose aviaire et humaine (représentant 80-90% des aspergilloses humaines) (Morin, 1994) ;

- *Aspergillus flavus* responsable d'aspergilloses pulmonaires ou généralisées principalement chez les patients immunodéprimés (Baculard et Tournier, 1995) ;

- *Aspergillus niger* rarement rencontré chez l'immunodéprimé ; chez le sujet non immunodéprimé il peut provoquer des aspergilloses, des otites et des sinusites ; il est aussi à l'origine d'infections cutanées, pulmonaires et généralisées (Morin, 1994) ;

- *Aspergillus sydowi* impliqué dans des cas d'endocardite humaine (Botton *et al.*, 1990) ;

- *Aspergillus terreus* est un agent important d'aspergilloses pulmonaires et cérébrales chez les patients immunodéficients ; il est souvent isolé des expectorations chez les patients atteints de mucoviscidose (Baculard et Tournier, 1995 ; Khan *et al.*, 1999) ; c'est aussi une espèce fréquemment isolée dans des prélèvements de peau et de phanères. Il est considéré comme le principal agent d'onychomycoses (Morin, 1994).

iii) Espèces utiles

Certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la fermentation de divers substrats et la production d'enzymes ou d'acides organiques :

- *Aspergillus awamori*, agent lipolytique d'oléagineux, est utilisé fréquemment au Japon pour la fermentation alcoolique.

- *Aspergillus niger* est utilisé dans les processus biotechnologiques pour la synthèse de différents acides comme l'acide citrique et l'acide gluconique ainsi que pour la production d'enzymes : alpha-amylase, beta-glucanase, catalase, glucose oxydase, lipase, pectinase, polygalacturonase.

- *Aspergillus oryzae* est utilisé, dans les pays asiatiques, pour la fabrication de produits fermentés à base de soja. Il est utilisé aussi dans des processus biotechnologiques

pour la production de certaines enzymes comme : alpha-amylase, beta-glucanase, lipase (Botton *et al.*, 1990).

1.3.2- Le Genre *Penicillium*

Ce genre réunit des champignons filamenteux, appartenant au phylum des *Ascomycètes*. Ce genre comprend environ 227 espèces définies essentiellement d'après les caractères du thalle, des pénicilles et des spores (Pitt, 1988). Les *Penicillium* sont des champignons pour la plupart très communs dans l'environnement, polyphages, pouvant être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour habitat naturel le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, le compost, les céréales.

Les espèces du genre *Penicillium* se développent normalement dans des milieux où l'activité de l'eau est plus élevée que celle permettant la croissance des *Aspergillus*, à des températures plus basses. Il s'agit de contaminants fréquents des régions tempérées.

1.3.2.1- Caractères cultureux généraux

Les *Penicillium* se développent rapidement et facilement sur les milieux de culture utilisés en routine (géloses au malt, Sabouraud). Ils se développent à des températures modérées de l'ordre de 20-27°C. Après 2 jours d'incubation, on observe des petites colonies plates, formées de courts filaments aériens, habituellement blancs. Après 3-4 jours d'incubation, la sporulation va conférer aux colonies leur teinte, le plus souvent dans les tons vert, vert bleu, vert-gris, vert-jaune, gris-bleu mais aussi, pour certaines espèces, jaune, orange, chamois, rose, ou rouge. Cette couleur permet une première orientation dans l'identification d'espèces : vert-gris pour *P. citrinum*, *P. cyclopium*, *P. italicum*, vert-jaune pour *P. chrysogenum*, vert sombre pour *P. roquefortii*, *P. fellutatum*, jaune pâle, chamois pour *P. nalgiovense*, jaune vif à rouge pour *P. purpurogenum*, mélange d'orange et verdâtre pour *P. islandicum*, et blanche pour *P. camembertii*. Le revers de colonies peut être incolore, jaune, rouge, brun ou noir et parfois le pigment diffuse dans le milieu de culture (Chermette et Bussieras, 1993).

Les *Penicillium* peuvent former des colonies floconneuses (*P. camembertii*, *P. nalgiovense*), funiculeuses (*P. funiculosum*), granuleuses (*P. expansum*, *P. griseofulvum*), veloutées (*P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. roquefortii*...) (Figure 10).

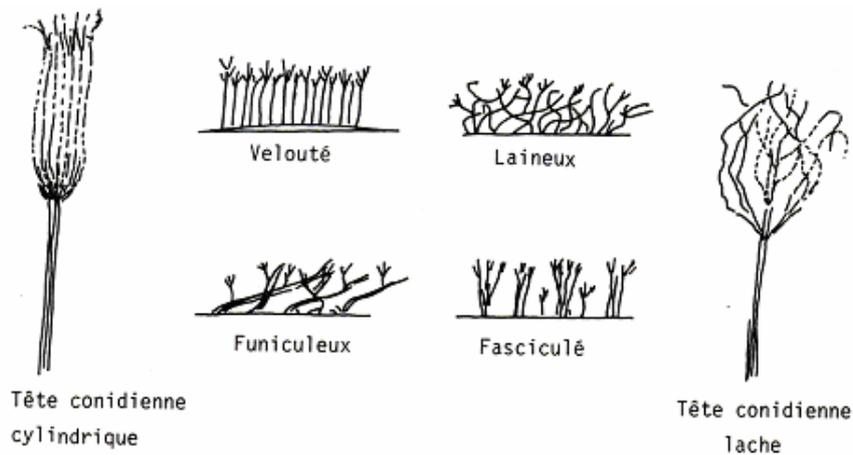


Figure 10. Caractères du thalle de genre *Penicillium* (Botton *et al.*, 1990).

1.3.2.2- Morphologie microscopique

Au point de vue morphologique les *Penicillium* se distinguent par leur organisation en pinceau. Le thalle, formé de filaments mycéliens septés et hyalins, porte des conidiophores lisses ou granuleux, simples ou ramifiés qui se terminent par un pénicille. Les conidiophores peuvent être isolés, groupés en faisceaux lâches ou agrégés en corémies bien individualisés (Figure 11).

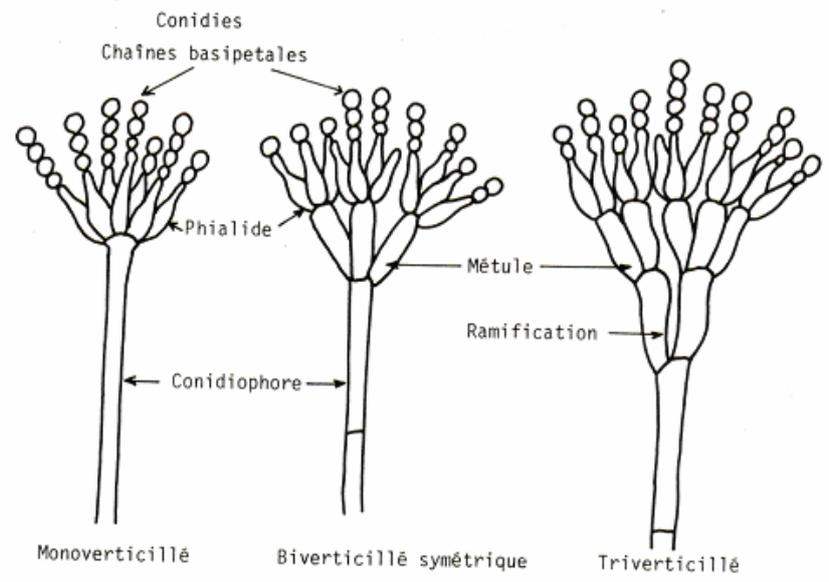


Figure 11. Caractères morphologiques des *Penicillium*.

Les phialides sont disposées en verticilles à l'extrémité des conidiophores. Les phialides peuvent être insérées directement (*Penicillium* monoverticillé) ou par l'intermédiaire d'une rangée de métules (*Penicillium* biverticillé); de deux rangées successives de métules (*Penicillium* triverticillé); parfois de trois rangées de métules (*Penicillium* quadriverticillé) sur les conidiophores. Les phialides, ampulliformes ou lancéolées, sont serrées les unes contre les autres donnant à l'ensemble un aspect de pinceau. Les phialides (cellules conidiogènes) donnent naissance à des conidies disposées en longues chaînes.

Les conidies 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 différenciation des groupes et des espèces. Certaines espèces peuvent présenter une reproduction sexuée avec la formation d'ascocarpes.

1.3.2.3.- Importance du genre *Penicillium*

i) Potentiel toxigène

La majorité d'espèces du genre *Penicillium* (Tableau 3) sont capables de produire des mycotoxines : l'acide cyclopiazonique (*Penicillium chrysogenum*), l'acide pénicillique (*Penicillium cyclopium*); la patuline ou la clavacine (*Penicillium expansum*, *Penicillium griseofulvum*), la citrinine (*Penicillium expansum*), l'ochratoxine A (*Penicillium verrucosum*) (Pitt, 2000).

Tableau 3. Les *Penicillium* producteurs des mycotoxines.

Espèces de <i>Penicillium</i>	Mycotoxines produites
<i>Penicillium chrysogenum</i>	acide cyclopiazonique, roquefortine C,
<i>Penicillium citreonigrum</i>	citréoviridine
<i>Penicillium crustosum</i>	pénitrem A, roquefortine C,
<i>Penicillium expansum</i>	citrinine, patuline, roquefortine C
<i>Penicillium griseofulvum</i>	acide cyclopiazonique, griséofulvine, patuline, roquefortine C
<i>Penicillium nalgiovense</i> (sin. <i>jensenii</i>)	pénicilline
<i>Penicillium oxalicum</i>	roquefortine C, acide sécalonique D
<i>Penicillium puberulum</i> (sin. <i>lanosum</i>)	griséofulvine, acide kojique
<i>Penicillium roquefortii</i>	acide pénicillique, roquefortine C, PR toxine
<i>Penicillium rubrum</i>	rubratoxine
<i>Penicillium rugulosum</i>	rugulosine, skirine
<i>Penicillium simplicissimum</i>	acide pénicillique, verrucologène
<i>Penicillium vatiabile</i>	rugulosine
<i>Penicillium verrucosum</i>	citrinine, ochratoxine A

ii) Pouvoir pathogène

Ces champignons sont des contaminants fréquemment isolés au laboratoire. Par contre les *Penicillium* sont très rarement incriminés en pathologie animale et humaine, parce que la température de croissance de la plupart des espèces est inférieure à 30°C. (Hennequin et Lavarde, 1998).

Les infections sont habituellement provoquées par l'inhalation des spores. Les premiers signes sont souvent pulmonaires. Des espèces de *Penicillium* sont responsables de kératomycose (inflammation de la cornée), d'otomycose (infection de l'oreille externe), d'onychomycose (infection des ongles) et parfois d'infections profondes (Hennequin et Lavarde, 1998).

Une seule espèce, *Penicillium marneffei*, rencontrée exclusivement en Asie du Sud-Est (Chine, Thaïlande, Laos, Birmanie) a pu être isolée chez des personnes immunodéprimées, notamment les patients infectés par le HIV; cette espèce est alors responsable d'infections systémiques touchant la peau et les organes profonds (foie, rate, ganglions, os,...) (Rosenthal *et al.*, 2000).

iii) Espèces utiles

De nombreuses espèces des *Penicillium* sont utilisées au niveau industriel pour la fabrication de fromages et salaisons ou pour la production des différents métabolites d'intérêt :

- *Penicillium camembertii* est utilisé dans la fromagerie pour la fabrication des fromages à pâte molle et croûte fleurie ;
- *Penicillium roquefortii* pour l'affinage des fromages à pâte persillée ;
- *Penicillium nalgiovense* pour l'amélioration des qualités organoleptiques des saucissons ;
- *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium notatum*, *Penicillium jensenii* (*P. nalgiovense*), sont utilisés pour l'obtention de différentes substances antibiotiques (Botton *et al.*, 1990).

1.3.3- Le genre *Fusarium*

Ce genre inclue des champignons imparfaits appartenant à la classe des *Deutéromycètes*. Les formes parfaites ou téléomorphes de quelques espèces de *Fusarium* sont connues, et appartiennent à la classe des *Ascomycètes* (ordre des *Hyphocreales*, famille des *Nectriaceae*, genres *Gibberella*, *Calonectria* et *Nectria*). Pour plusieurs espèces de *Fusarium*, le stade

parfait n'est pas connu. Le genre comprend près de 40 espèces souvent largement répandues (Nelson *et al.*, 1983).

Sur le plan économique le genre *Fusarium* est très important parce qu'il regroupe beaucoup d'espèces phytopathogènes, susceptibles d'induire des maladies (fusarioses) chez de nombreuses plantes. De plus, beaucoup d'espèces saprophytes sont capables de se développer en tant que pathogènes secondaires sur des tissus végétaux sénescents. Les espèces du genre *Fusarium* peuvent ainsi attaquer les céréales (maïs, blé, orge, avoine), des légumes, les plantes ornementales et beaucoup d'arbres fruitiers. La majorité des espèces de *Fusarium* sont susceptibles de produire des mycotoxines et sont ainsi impliquées dans des intoxications chez les animaux d'élevage.

1.3.3.1- Caractères cultureux généraux

Les *Fusarium* poussent sur milieu Sabouraud, mais se développent mieux sur gélose au malt ou sur milieu PDA (potato-dextrose-agar). Leur température optimale de croissance est comprise entre 22 et 37°C.

Sur les milieux de culture, les *Fusarium* forment des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleur variable (blanche, crème, jaune, rose, rouge, violette ou lilas) selon les espèces. Le revers peut être crème, rouge à pourpre, lilas ou violet. Les pigments diffusent souvent dans la gélose (Chermette et Bussieras, 1993).

1.3.3.2- Morphologie microscopique

Le principal caractère morphologique des *Fusarium* est la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées (le nom de *Fusarium* vient du latin « *fusus* » car les spores de ces moisissures sont en forme de fuseau). Dans la figure 12 sont présentés les principaux caractères morphologiques de genre *Fusarium*.

Les conidiophores, parfois très ramifiés, forment sur le thalle des coussinets (sporodochies) et portent des masses de spores.

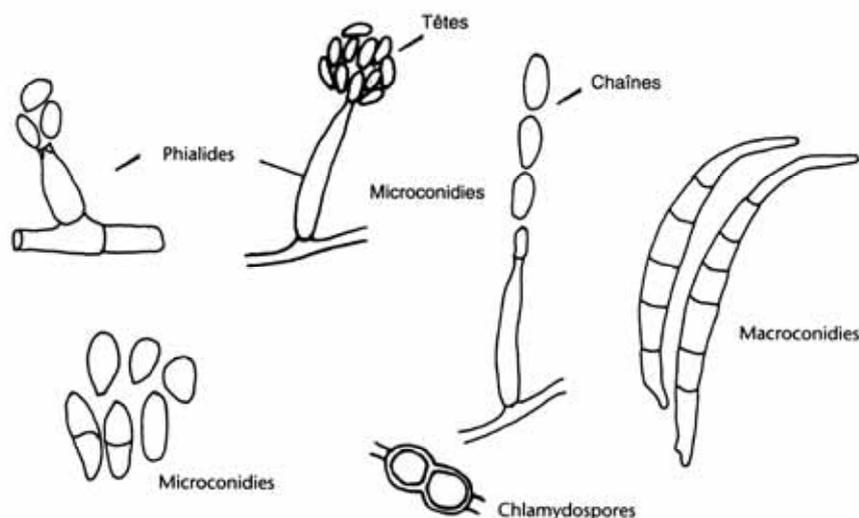


Figure 12. Caractères morphologiques des *Fusarium*.

Les phialides, plus ou moins allongées, présentent, le plus souvent, un site de bourgeonnement 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 bourgeonnement (polyphialides).

Les phialides produisent deux types de conidies :

- microconidies – uni- ou bicellulaires, piriformes, fusiformes, cylindriques ou ovoïdes, isolées, solitaires ou groupées, disposées en verticille ou plus rarement en chaînettes (*F. verticilloides*) ;
- macroconidies – conidies pluricellulaires à cloisons seulement transversales, souvent groupées en paquets. Les macroconidies sont fusiformes, souvent courbées, avec une cellule basale pédicellée, formant un sort de talon plus ou moins visible.

Les chlamydospores, sont parfois présentes, en position terminale ou intercalaire (Roquebert, 1998).

1.3.3.3- Principales espèces de *Fusarium*

Compte tenu de leur fréquence dans les différents substrats, notamment les céréales, de leur potentiel toxigène et de leur pouvoir pathogène, les principales espèces de *Fusarium* sont : *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* et *F. verticilloides* (*F. moniliforme*).

i) Fusarium culmorum

Caractères cultureux: Cette moisissure pousse rapidement sur géloses PDA et au malt. Les colonies sont duveteuses, d'abord blanches à jaunâtres ou roses puis ocracées à rouges brunâtre. Le revers est rouge à pourpre.

Morphologie microscopique: Les phialides, courtes et larges, formées sur le mycélium aérien, sont groupées en sporodochies. Les microconidies sont absentes. Les macroconidies sont fusiformes, courbées et septées (5 cloisons en moyenne, 3-8). La cellule apicale est courte et pointue (26-50 x 4-7 µm). Les chlamydospores, intercalaires ou terminales, formées par le mycélium ou par les conidies, sont sub-globuleuses, brunâtres, lisses ou verruqueuses (9-14 µm de diamètre). Dans la figure 13 sont présentés les principaux caractères morphologiques de *F. culmorum*.

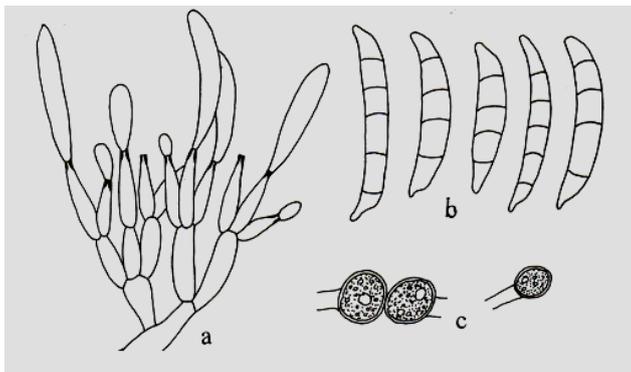


Figure 13. *Fusarium culmorum*

Caractères morphologiques:
a: macrophialides et macroconidies;
b: macroconidies;
c: chlamydospores.

ii) Fusarium graminearum (forme parfaite: *Gibberella zeae*)

Caractères cultureux: Ce champignon se développe vite sur les géloses PDA et au malt. Les colonies, floconneuses, sont au début roses grisâtres ou rouges à pourpres, puis deviennent brun vineux. Le revers est rouge à pourpre. Le pigment diffuse dans la gélose.

Morphologie microscopique: Les phialides (10-14 x 3,5-5 µm) peuvent s'agréger en sporodochies. Les microconidies sont absentes. Les macroconidies sont fusiformes, courbées, et présentent 3 à 7 septum. La cellule terminale est longue et pointue (25-62 x 2,5-5 µm). Les chlamydospores, intercalaires, formées par le mycélium rarement dans les conidies, sont globuleuses, hyalines à brun pâle (8-12 µm en diamètre) (figure 14).

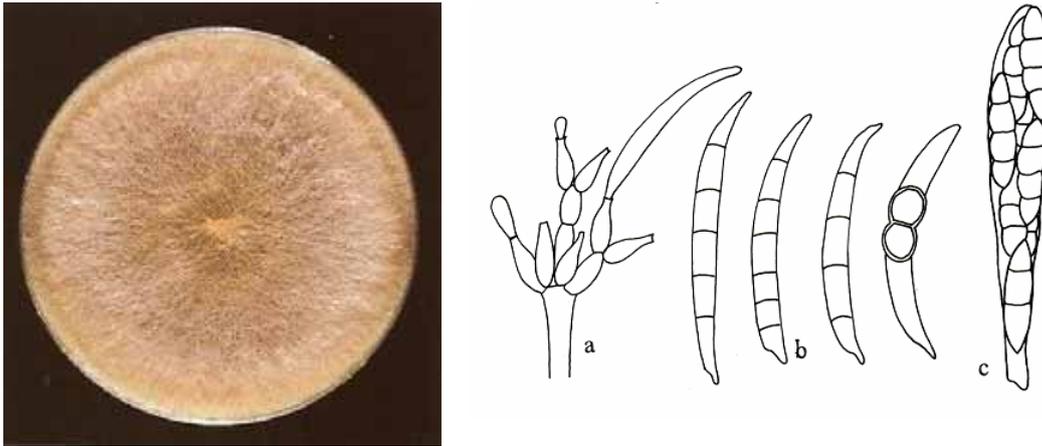


Figure 14. *Fusarium graminearum*

(culture de 7 jours sur milieu PDA à 25°C et caractères microscopiques:
a: macrophialides et macroconidies; b: macroconidies; c: asque octosporé).

Dans la nature, *F. graminearum* est capable de former des périthèces, superficiels, ovoïdes, garnis de tubercules (140-250 µm) sur un grand nombre de graminées. Les asques, clavés, contiennent 8 ascospores, hyalines ou brun très clair, fusiformes, triseptées.

iii) *Fusarium oxysporum*

Caractères cultureux: Ce champignon à une vitesse de croissance modérée sur les milieux de culture utilisés au laboratoire. Les colonies, sont blanches, pêches, roses saumon à violet. Le revers est pourpre.

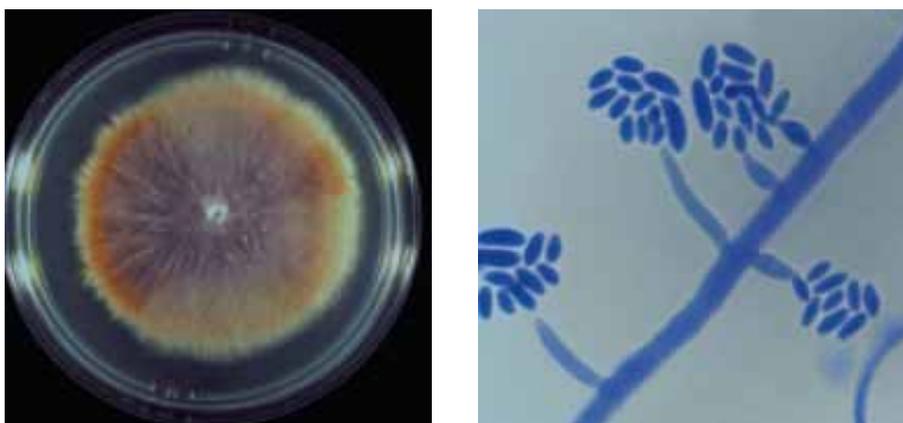


Figure 15. *Fusarium oxysporum*

(culture de 7 jours sur milieu PDA à 25°C et aspect microscopique).

Morphologie microscopique: Les microphialides (10-14 x 3,5-5 µm) peuvent s'agréger en sporodochies. Les microconidies sont ellipsoïdales, isolées ou potées par des conidiophores courts et ramifiés. Les microconidies sont abondantes, ovoïdes. Les macrophialides sont éparses ou groupées en sporodochies (Figure 15). Les macroconidies sont fusiformes, plus ou moins courbées, pointues aux deux extrémités, présentant 3 à 5 septum. Elles mesurent 27-65 x 3-5 µm. Les chlamydo-spores, terminales ou intercalaires, formées dans le mycélium et dans les conidies, sont sub-globuleuses et hyalines (5-15 µm de diamètre).

iv) Fusarium verticillioides (anciennement F. moniliforme) (forme parfaite: Gibberella fujikuroi)

Caractères cultureux: Ce champignon se développe rapidement sur les milieux classiques de culture (PDA et gélose au malt). Le thalle, d'abord blanc à pêche ou rose saumon, devient vinacé à violet. Le mycélium aérien est dense, floconneux d'aspect poudreux. Le revers peut être violet foncé, lilas, vinacé ou crème.

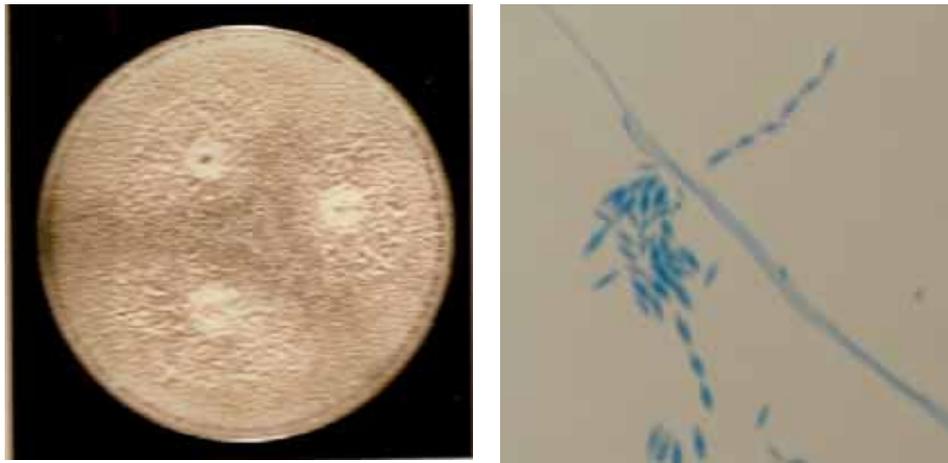


Figure 16. *Fusarium verticillioides* Sin. *F. moniliforme* (culture de 7 jours sur milieu PDA à 25°C et aspect microscopique).

Morphologie microscopique: Les microphialides, subulées, sont formées sur le mycélium aérien (20-30 x 2,5-4 µm). Les microconidies ellipsoïdales sont disposées en chaînes (Figure 16). Elles ont un aspect fusiformes, unicellulaires ou parfois uniseptées. Leur taille est d'environ 5-12 x 1,5-2,5 µm. Les macrophialides sont groupées par 2 ou 3 sur une ramification courte. Les macroconidies sont rares, en fuseau allongé, avec 3 à 7 cloisons. Les chlamydo-spores sont absents.

Les périthèces, qui peuvent être formés lors du développement de cette espèce sur des végétaux morts, sont superficiels, bleu noir, globuleux, et mesurent 250-350 µm. Les asques, clavés contiennent 4-8 ascospores hyalines, elliptiques, le plus souvent uniseptées, parfois triseptées.

1.3.3.4- Importance du genre *Fusarium*

i) Potentiel toxigène

Le genre *Fusarium* comprend des espèces capables de produire de nombreuses mycotoxines : les trichothécènes, la zéaralénone et les fumonisines (Tableau 4).

- *Fusarium poae*, *F. sporotrichioides*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. graminearum* produisent des trichothécènes de types A et B ;

- *Fusarium verticillioides* (moniliforme) et *F. proliferatum* synthétisent les fumonisines ;

- *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* et *F. sporotrichioides* produisent de la zéaralénone (Pitt, 2000).

Tableau 4. Les *Fusarium* producteurs des mycotoxines

Espèces de <i>Fusarium</i>	Mycotoxines produites
<i>Fusarium acuminatum</i>	moniliformine, trichotécènes type A
<i>Fusarium anthophilum</i>	moniliformine
<i>Fusarium avenaceum</i>	fusarine C, moniliformine
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	moniliformine
<i>Fusarium cerealis</i> (sin. <i>crookwellense</i>)	culmorine, fusarine C, trichotécènes type B
<i>Fusarium culmorum</i>	culmorine, fusarine C, trichotécènes type B, zéaralénone
<i>Fusarium graminearum</i>	trichotécènes type B, zéaralénone
<i>Fusarium oxysporum</i>	acide fusarique, moniliformine, oxysporine
<i>Fusarium pallidoroseum</i> (sin. <i>semitectum</i>)	moniliformine, zéaralénone
<i>Fusarium poae</i> (sin. <i>tricinctum</i>)	fusarine C, trichotécènes type A
<i>Fusarium proliferatum</i>	moniliformine
<i>Fusarium sacchari</i>	moniliformine
<i>Fusarium sambucinum</i>	fusarine C, trichotécènes type A
<i>Fusarium solani</i>	acide fusarique, naftoquinone
<i>Fusarium sporotrichoides</i>	fusarine C, trichotécènes type A, zéaralénone
<i>Fusarium verticillioides</i> (sin. <i>moniliforme</i>)	fumonisines, fusarine C, gibberelines, moniliformine, naftoquinone

ii) Pouvoir pathogène

Les *Fusarium* sont, principalement, des phytopathogènes. Ces champignons contaminent les céréales, les légumes, les arbres fruitiers provoquant des maladies nommées fusarioses. Les *Fusarium* sont généralement impliqués dans la pourriture des racines, tiges et fruits ; dans la dégradation du système vasculaire (Trenholm *et al.*, 1988).

Le pouvoir pathogène chez l'homme et les animaux est varié. Certaines espèces sont à l'origine des kératites et endophtalmies. D'autres espèces (*F. solani*, *F. moniliforme*) sont impliquées dans des infections systémiques (Guarro et Gene, 1992)

- *Fusarium verticillioides* peut être un agent de fusarioses disséminées chez les patients infectés par le HIV (Duran *et al.*, 1989).

- *Fusarium oxysporum* est un agent d'onyxis, de kératites, d'endophtalmies, de péritonites et d'infections disséminées chez les patients atteints d'hépatocarcinome (Thomas et Geraldine, 1992).

- *Fusarium solani* est l'espèce la plus commune, impliquée dans les fusarioses rencontrées aux patients diabétiques. Il peut également être responsable des ulcères cornéens (del Palacio *et al.*, 1985 ; Gari-Toussaint *et al.*, 1997).

2- Contamination des aliments par les moisissures

2.1- Conditions de développement des moisissures

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes: elles peuvent se développer seulement si le milieu lui apporte les éléments nutritifs nécessaires. La paroi rigide de la cellule fongique l'empêche de phagocyter les substances nutritives complexes du milieu; la moisissure est obligée les transformer préalablement en molécules simples absorbables. Ceci est rendu possible grâce à des dépolymérase qui sont excrétées dans l'environnement. Sous leurs actions les polymères complexes sont transformés en molécules simples (monosaccharides, acides gras, acides aminés).

Comme tout micro-organisme, la croissance fongique est aussi dépendante d'un certain nombre de paramètres intrinsèques et extrinsèques du milieu.

2.1.1- Activité en eau (Aw)

L'Aw d'un aliment dépend de sa composition chimique, c'est-à-dire de la quantité d'eau retenue par les sels, sucres et protéines, ainsi que de ses caractéristiques physiques (porosité, polarité). Ce paramètre peut varier de 0 (pour les substrats dans lesquels toute l'eau est retenue) à 1 (pour l'eau pure).

Les moisissures sont, de façon schématique, plus xérotolérantes que les autres microorganismes (bactéries, levures). La plupart des moisissures 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 moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont généralement capables se développer à des Aw voisines de 0,7 à 25°C ; elles peuvent donc se développer dans les aliments pauvres en eau comme les céréales au cours de stockage, les fruits secs, les produits dont l'activité hydrique a été réduite (produits de salaison sèche, confitures,...) (Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002). Par comparaison, les *Fusarium* ne peuvent pas se développer que pour des Aw supérieurs à 0,9. Il s'agit donc d'espèces se développant au champ, sur les plantes vivantes (Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002).

2.1.2- pH

Les micromycètes peuvent se développer dans une large gamme de pH ; elles se développent normalement pour des pH compris entre 3 et 8, leur croissance étant normalement optimale entre 5 et 6. En raison de leur acidité (pH < 6) de nombreux aliments comme les légumes et les fruits sont beaucoup plus exposés à une altération fongique que bactérienne.

En 1997 Keller a étudié l'effet de pH sur la croissance de *Fusarium proliferatum* (Tableau 5). La croissance de champignon était maximale à un pH=5,6 (Keller *et al.*, 1997).

Tableau 5. Influence de pH sur la croissance de *Fusarium proliferatum*.

Keller, 1997	
pH	Biomasse (g/l)
2,2	11,7 ± 2,7
2,6	11,1 ± 1,2
3,0	12,0 ± 2,6
3,7	13,8 ± 1,4
4,2	16,7 ± 1,6
5,6	24,4 ± 2,0

2.1.3- Présence d'oxygène

Les champignons sont des microorganismes aérobies ; ils ont besoin d'oxygène pour une croissance normale. Toutefois, leur développement est peu affecté par des teneurs de 10 fois plus faibles (2,1%) que celle de l'atmosphère. En conséquence, certaines espèces de moisissures pourront se développer sur les denrées alimentaires conservées dans une atmosphère pauvre en oxygène.

Par exemple, *Aspergillus flavus* peut se développer dans une atmosphère qui contient 61,7% CO₂, 8,7% O₂ et 29,7% N₂; la moisissure est, en fait, plus sensible à la concentration de CO₂ qu'à celle en O₂ et en N₂. Elle est en effet capable de se développer en présence de grandes concentrations de N₂ (99%) ou de faibles concentrations d'O₂ (0,5%), mais une concentration de 80% CO₂ inhibe sa croissance. De même, le développement d'*Aspergillus ochraceus* est complètement inhibé par une teneur de 80% de CO₂ (Pfohl-Leszcowicz, 2001).

Penicillium verrucosum peut supporter des concentrations de CO₂ allant jusqu'à 25% sans modification significative de son développement; à partir de 25% de CO₂, la croissance du champignon est diminuée de 40% et de presque 75% dans une atmosphère contenant 50% de CO₂ (Cairns-Fuller *et al.*, 2005).

Par contre *Fusarium proliferatum* est, quant à lui, dépendant de la présence d'oxygène (Keller *et al.*, 1997) et l'absence d'O₂ réduit considérablement la biomasse fongique.

Certaines espèces peuvent se développer en anaérobiose : c'est le cas du *Byssoschlamys* qui contamine les jus de fruits conservés par pasteurisation (Pfohl-Leszcowicz, 2001).

2.1.4- Température

Les moisissures sont généralement mésophiles : la croissance des hyphes est optimale à 20-25°C. En dehors de cet intervalle de température les hyphes se développent plus lentement. Les spores de moisissures mésophiles ne peuvent pas germer à une température inférieure à 5°C, mais elles peuvent résister longtemps aux basses températures allant jusqu'à -20°C (Pfohl-Leszcowicz, 2001).

Il existe aussi des espèces psychrophiles, comme, par exemple, *Penicillium expansum*, *P. verrucosum*, *P. viridicatum*. Elles peuvent se développer, lentement, à des températures basses, inférieures à 4°C. Ces espèces sont responsables des altérations d'aliments conservés au froid (Pfohl-Leszcowicz, 2001).

Les espèces thermophiles sont plus rares. C'est le cas de l'*Aspergillus flavus*. La température optimale pour sa croissance est comprise entre 25 et 35°C, mais cette moisissure peut se développer bien dans un intervalle plus large (15-45°C) et parfois jusqu'à 50°C (Castegnaro,

Pfohl-Leszkowicz, 2002). Ces caractéristiques physiologiques (besoin d'une faible teneur en eau et développement possible dans un large intervalle de température) font que cette espèce très fréquemment impliquée dans la détérioration des matières premières et des aliments (Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002).

Il faut souligner que les moisissures sont, pour la très grande majorité, sensibles à une élévation de la température et un traitement de cuisson ou de pasteurisation permet le plus souvent de détruire les mycéliums ainsi que les spores fongiques (Pfohl-Leszkowicz, 2001). Toutefois, les mycotoxines sont, elles, pour la plupart thermorésistantes (voir plus loin).

2.1.5- Lumière

La lumière favorise la maturation des conidies et la germination des spores. Les moisissures sont, généralement, indifférentes à l'action de lumière. Toutefois, certaines espèces (les *Tuberales*) ne supportent pas la lumière et se développent dans des endroits obscurs (grottes); Inversement, d'autres se développent sur les versants de montagne ensoleillés en permanence ou dans les régions désertiques (les *Discomycetes*) (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

2.1.6- Interactions microbiennes

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 des interactions entre les différentes espèces. Les conditions environnementales peuvent favoriser certaines espèces et défavoriser les autres. Par exemple, les *Mucoraceae*, caractérisés par une vitesse de croissance apicale élevée envahissent rapidement le milieu en inhibant le développement des espèces se développant plus lentement. La synthèse des substances toxiques (mycotoxines) et leur accumulation dans le milieu peut aussi avoir un effet inhibiteur sur le développement d'autres espèces (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

2.1.7- Présence d'insectes

Les insectes représentent les principaux vecteurs de spores de moisissures au champ et dans les lieux de stockage (Pfohl-Leszkowicz, 2001). Les insectes, en dégradant la paroi des grains, favorisent la contamination par les moisissures et la production des mycotoxines.

Les acariens sont des vecteurs importants de spores, ils vivent sur les grains moisissés, récupèrent et transportent ensuite les spores sur la surface de leur corps et dans leur tube digestif (Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002).

Les charançons, dont les larves se développent dans l'environnement des grains, transportent aussi les spores de champignon dans les lieux de stockage des grains (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

Les chenilles et les coléoptères sont souvent associés avec la contamination du maïs par les aflatoxines (Hubert *et al.*, 2004). De même, la contamination d'arachides avec *Aspergillus flavus* avant la récolte est souvent associée avec l'attaque d'insectes (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

De manière générale, de nombreux insectes qui attaquent les plantes contribuent à leur infestation par des moisissures, avant même la formation de l'épi.

En 1996, Sobek a ainsi démontré expérimentalement le rôle des larves d'insectes dans l'infestation du maïs par *Fusarium verticillioides* (Sobek, 1996).

Plus récemment, une expérimentation similaire effectuée par Hubert (2004) en République Tchèque a mis en évidence le rôle de coléoptères (mites) dans l'infestation fongique d'aliments à base de céréales ainsi que leur rôle dans la production de mycotoxines (Hubert *et al.*, 2004). L'analyse des spores fongiques présentes sur la surface du corps des mites et dans leur intestin a révélé la présence de spores d'*Aspergillus flavus*, de *Penicillium brevicompactum*, de *P. chrysogenum*, de *P. cyclopium*, de *P. griseofulvum*, de *Botrytis cinerea*, de *Cladosporium herbarum*, et d'*Alternaria alternata*. Ces différentes espèces fongiques ont, ensuite, été retrouvées dans les échantillons d'aliments analysés (Hubert *et al.*, 2004).

Les insectes interviennent aussi dans les locaux de stockage: les échantillons de maïs et d'orge qui contiennent des charançons sont aussi généralement contaminés par une population fongique importante (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

Il faut souligner que, pendant le stockage de céréales, les oiseaux et les rongeurs peuvent avoir le même rôle de vecteur de spores fongiques (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

2.2- Contamination des aliments par les moisissures

Les moisissures sont des microorganismes ubiquistes qui peuvent se développer sur une grande variété de substrats. Les espèces de moisissures les plus fréquentes retrouvées dans les aliments appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Ces moisissures peuvent proliférer et produire des mycotoxines avant ou après la récolte, pendant le stockage, le transport, ou la transformation des matières premières et des aliments.

2.2.1- Contamination de céréales et produits végétaux

2.2.1.1- Les céréales

Les céréales sont sans doute les denrées alimentaires les plus fréquemment contaminées par les moisissures. La contamination peut avoir lieu avant la récolte, au champ, au cours du séchage, du stockage et après transformation des graines.

Si de très nombreuses études sont disponibles concernant la contamination mycotoxique des céréales, les enquêtes sur la contamination fongique de ces matières premières sont plus rares. De manière schématique, elles mettent en évidence une relation entre la flore fongique et les conditions climatiques pendant le développement et/ou le stockage des grains.

Tableau 6. Présence des *Aspergillus* dans les céréales des différents pays.

Pays	Céréales	Espèces identifiées	Nombre d'échantillons	Fréquence de contamination (%)	Références
Argentine	maïs	<i>A. flavus</i>		78	Etcheverry, 1999
		<i>A. parasiticus</i>		21	
Brésil		<i>Aspergillus spp.</i>	150	27,7	Ono, 1999
Espagne		<i>Aspergillus spp.</i>	60	14,19	Arino, 2007
Etats Unis		<i>A. ochraceus</i>	85	68,4	Trucksses, 1999
Ghana		<i>Aspergillus spp.</i>	50	76,4	Kpodo, 2000
Inde		<i>A. flavus</i>	197	55-62	Janardhana, 1999
		<i>A. candidus</i>		30-33	
		<i>A. fumigatus</i>		18-33	
		<i>A. terreus</i>		10-11	
Iran		<i>Aspergillus spp.</i>	50	8,7	Ghiasian, 2004
Nigeria		<i>A. flavus</i>	89	49,4	Bankole, 2004
Venezuela		<i>A. flavus</i>		80	Medina-Martinez, 2000
		<i>A. parasiticus</i>			
Lituanie	blé	<i>Aspergillus spp.</i>	33	1,4-3	Baliukoniene, 2003
Pologne		<i>Aspergillus spp.</i>	20	76,5	Krysinska-Traczyc, 2001
Espagne	orge	<i>Aspergillus spp.</i>	184	82,3	Medina, 2006
Etats Unis		<i>A. ochraceus</i>	85	93,6	
Lituanie	seigle	<i>Aspergillus spp.</i>	22	6, 3-6,8	Baliukoniene, 2003
Corée	riz	<i>A. candidus</i>	88	26	Park, 2005
		<i>A. flavus</i>		17	
		<i>A. niger</i>		18	
		<i>A. ochraceus</i>		7	
		<i>A. versicolor</i>		20	
Vietnam		<i>A.s flavus</i>	25	40	Tran, 2001
		<i>A. fumigatus</i>		23	
		<i>A.oryzae</i>		11	

Ainsi, les *Aspergillus* sont souvent retrouvés dans les céréales issus des régions chaudes, parfois à des fréquences très élevées : 82.3% des échantillons d’orge en Espagne (Medina *et al.*, 2006). 76,4%, 78% et 82,3% des échantillons de maïs produits au Ghana (Kpodo *et al.*, 2000), en Argentine (Etcheverry *et al.*, 1999) et au Venezuela (Medina-Martinez et Martinez, 2000) ont été trouvés contaminés par des *Aspergillus*. Les principaux résultats concernant la contamination des céréales par les *Aspergillus* sont regroupés dans le Tableau 6.

Les espèces du genre *Penicillium* prolifèrent en présence d’une activité hydrique relativement faible et à basse température. Ces espèces sont fréquemment isolées des céréales produites dans les pays tempérés. On les retrouve aussi dans les grains stockés dans des pays dont le climat est plus chaud (Amérique du Sud, Asie). Par exemple, 57% des échantillons d’orge en Espagne contenaient des *Penicillium* (Medina *et al.*, 2006), mais aussi 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 (Etcheverry *et al.*, 1999 ; Janardhana *et al.*, 1999 ; Ono *et al.*, 1999). Les principaux résultats concernant la contamination des céréales par les *Penicillium* sont présentés dans le tableau 7. Il faut souligner que, compte tenu de la difficulté de l’identification des *Penicillium*, les données ne précisent pas la nature exacte des espèces présentes (Tableau 7).

Tableau 7. Présence des *Penicillium* dans les grains de céréales pour différents pays.

Pays	Céréales	Espèces identifiées	Nombre d'échantillon	Fréquence (%)	Références
Argentine	maïs	<i>Penicillium spp.</i>		67	Etcheverry, 1999
Brésil		<i>Penicillium spp.</i>	150	93-100	Ono, 1999
Espagne		<i>Penicillium spp.</i>	60	9,4	Arino, 2007
Ghana		<i>Penicillium spp.</i>	50	19,9	Kpodo, 2000
Inde		<i>Penicillium spp.</i>	197	50-83	Janardhana, 1999
Iran		<i>Penicillium spp.</i>	50	4,8	Ghiasian, 2004
Lituanie		blé	<i>Penicillium spp.</i>	33	38-61
Pologne	<i>Penicillium spp.</i>		20	3,4	Krysinska-Traczyc, 2001
Espagne	orge	<i>Penicillium spp.</i>	184	57.8	Medina, 2006
Lituanie	seigle	<i>Penicillium spp.</i>	22	33,4-54	Baliukoniene, 2003
Corée	riz	<i>P. citrinum</i>	88	27	Park, 2005
		<i>P. islandicum</i>		15	
		<i>P. verrucosum</i>		11	
Vietnam		<i>Penicillium spp.</i>	25	10,94	Tran, 2001

Les espèces de *Fusarium* se développent, de préférence, sous des climats moins chauds et plus humides. Une étude effectuée sur 4 ans, en Russie, a mis en évidence la présence d'espèces de *Fusarium* dans 5 à 100% des échantillons de blé analysés (Tutelyan, 2004). En 1998, au Brésil, des espèces de *Fusarium* ont été retrouvées dans 98,7 à 100% des échantillons analysés (Ono *et al.*, 1999). Les espèces les plus fréquentes sont, en général, *F. graminearum*, dans l'orge (Usleber *et al.*, 1996) et le maïs (Park *et al.*, 1996 ; Molto *et al.*, 1997), *F. verticilloides* dans le maïs (Ono *et al.*, 1999 ; Kpodo *et al.*, 2000 ; Kedera *et al.*, 1999 ; Bankole et Mabekoje, 2004 ; Janardhana *et al.*, 1999). Un récapitulatif des données relatives à la contamination des céréales par les *Fusarium* est présenté dans le Tableau 8.

Tableau 8. Présence des *Fusarium* dans les grains de céréales pour différents pays.

Pays	Céréale	Espèces identifiées	Nombre d'échantillon	Fréquence (%)	Références
Argentine	maïs	<i>F. moniliforme</i>		42	Etcheverry, 1999
		<i>F. nygamai</i> <i>F. proliferatum</i>		56 1,8	
Brésil	maïs	<i>F. graminearum</i>	42	64	Molto, 1997
		<i>F. sporotrichioides</i>		11,9	
		<i>F. semitectum</i>		11,9	
		<i>F. solani</i>		4,7	
		<i>F. equseti</i>		2,3	
		<i>F. heterosporum</i>		2,3	
		<i>F. oxysporum</i>		2,3	
Brésil	maïs	<i>F. verticilloides</i>	84	55	Almeida, 2002
		<i>Fusarium spp.</i> <i>F. verticilloides</i>	150	98,7-100 85,9	Ono, 1999
Espagne	maïs	<i>F. verticilloides</i>	60	50	Arino, 2007
Etats Unis	maïs	<i>F. poae</i>	98	44,7	Park, 1996
		<i>F. sporotrichioides</i>		56,5	
		<i>F. graminearum</i>		67,1	
		<i>F. subglutinans</i>		57,6	
		<i>F. moniliforme</i>		22,4	
		<i>F. proliferatum</i>		41,2	
Ghana	maïs	<i>Fusarium spp.</i>	50	26	Kpodo, 2000
Inde	maïs	<i>F. moniliforme</i>	197	30-80	Janardhana, 1999
Indonésie	maïs	<i>F. moniliforme</i>	60	50	Ali, 1998
		<i>F. nygamai</i>		6	
		<i>F. proliferatum</i>		12	
		<i>F. decemcellulare</i>		38	
Iran	maïs	<i>Fusarium spp.</i>	50	38,5	Ghiasian, 2004
Kenya	maïs	<i>F. graminearum</i>	153	31,37	Kedera, 1999
		<i>F. solani</i>		18,3	
		<i>F. moniliforme</i>		60,13	
		<i>F. subglutinans</i>		3,2	
		<i>F. oxysporum</i>		5,2	
Nigeria	maïs	<i>Fusarium verticilloides</i>	89	89	Bankole, 2004

Venezuela		<i>F. moniliforme</i> <i>F. proliferatum</i>		80	Medina-Martinez, 2000
Argentine	blé	<i>F. poae</i>	50	7,8	Moreno-Contreras, 2000
		<i>F. sporotrichioides</i>		7,8	
Lituanie		<i>Fusarium spp.</i>	33	10-18	Baliukoniene, 2003
Pologne		<i>F. avenaceum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. sporotrichioides</i> <i>F. poae</i>	20	50 10 20 20 40	Krysinska-Traczyc, 2001
Russie		<i>Fusarium spp.</i>	5652	5-100	Tutelyan, 2004
Canada	orge	<i>F. graminearum</i> <i>F. sporotrichioides</i> <i>F. poae</i> <i>F. avenaceum</i>	596	71,81 3,1 3,3 10	Usleber, 1996
Espagne		<i>Fusarium spp.</i> <i>F. verticilloides</i>	184	27,8 61,3	Medina, 2006
Russie		<i>Fusarium spp.</i>	5652	0-16	Tutelyan, 2004
Lituanie		seigle	<i>Fusarium spp.</i>	22	13,7-17,2
Russie	<i>Fusarium spp.</i>		5652	0-27	Tutelyan, 2004
Corée	riz	<i>F. graminearum</i> <i>F. oxysporum</i> <i>F. proliferatum</i> <i>F. semitectum</i>	88	10 11 16 7	Park, 2005
Vietnam		<i>Fusarium spp.</i>	25	21,88	Tran, 2001

2.2.1.2- Aliments composés pour les animaux

Les aliments composés peuvent être contaminés par les spores qui étaient initialement présentes dans les céréales ou dans les autres ingrédients (oléagineux) qui entrent dans leur composition. Ils peuvent aussi être contaminés au cours du processus de fabrication ou pendant le stockage. Les espèces de moisissures les plus fréquemment retrouvées dans les aliments composés appartiennent aux mêmes genres que ceux contaminant les céréales : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*.

Les études disponibles concernant l'évaluation du niveau de contamination fongique des aliments pour animaux concernent en général les aliments composés pour animaux monogastriques (volailles, porcs...) qui sont plus sensibles à l'action des mycotoxines que les ruminants.

Malgré un processus technologique permettant souvent la réduction de la contamination fongique à cause de l'élévation de température (pendant la granulation par exemple), les résultats disponibles montrent souvent une contamination fréquente par de nombreuses espèces fongiques.

Par exemple, une enquête menée en Slovaquie a montré que 89% des échantillons contenaient des *Penicillium*, 69% des *Aspergillus* et 42% des *Fusarium* (Labuda et Tancinova, 2006). Ces fréquences de contaminations sont comparables avec celles obtenues dans des enquêtes réalisées en Argentine (Dalcero *et al.*, 1997 ; Dalcero *et al.*, 1998). Lorsque l'analyse va jusqu'à la détermination de l'espèce, les espèces les plus fréquentes sont, en général: *A. ochraceus*, retrouvé dans 78-100% des échantillons d'aliments composés pour lapins, porcs et volailles en Argentine (Dalcero *et al.*, 2002) et *F. verticilloides* retrouvé dans 73% dans les aliments composés pour les volailles (Dalcero *et al.*, 1997). Les données relatives à la contamination fongique des aliments composés pour animaux sont répertoriées dans le Tableau 9.

Tableau 9. Présence de moisissures dans les aliments composés pour les animaux.

Pays	Destination	Espèces fongiques identifiées	Nombre d'échantillons	Fréquence de contamination (%)	Références		
Argentine	volailles	<i>A. flavus</i>	96	12-14	Rosa, 2006		
		<i>A. niger</i>					
		<i>A. ochraceus</i>					
		<i>Aspergillus spp.</i>	130			85	
		<i>Fusarium spp.</i>					70
		<i>Penicillium spp.</i>					
	<i>Aspergillus spp.</i>	130	85				
	<i>Fusarium spp.</i>			70			
	<i>Penicillium spp.</i>						41
lapins	<i>A.ochraceus</i>	130			78-100		
porcs	<i>A. niger</i>						
volailles	<i>A. japonicus</i>			61			
Brésil	volailles	<i>Penicillium spp.</i>			41.26	Oliveira, 2006a	
		<i>Aspergillus spp.</i>			33.33		
		<i>Fusarium spp.</i>			20.63		
Slovaquie		<i>Penicillium spp.</i>	50	89	Labuda, 2006		
		<i>Aspergillus spp.</i>		69			
		<i>Fusarium spp.</i>		42			
Roumanie	volailles	<i>F.culmorum</i>	22	42 ,8	Tabuc, 2007		
		<i>F. graminearum</i>					
		<i>F.moniliforme</i>					
		<i>F.oxysporum</i>		33,33			
		<i>F.sporotrichioides</i>					
		<i>P. brevicompactum</i>					
<i>P. citrinum</i>	14,2						
<i>P. purpurogenum</i>							
<i>A. flavus</i>							
	<i>A. fumigatus</i>						
	<i>A. niger</i>						

2.2.1.3- Produits alimentaires à base de céréales

Les céréales représentent une matière première importante pour l'alimentation. Elles sont transformées en farines à partir desquelles sont élaborés de nombreux aliments finis comme produits issus de la panification, de la biscuiterie, les céréales pour le petit déjeuner, les gâteaux... Ces produits, comme les aliments composés pour les animaux, peuvent être contaminés soit par les spores qui se trouvent initialement dans les céréales, soit plus tard, pendant le stockage. Les principales espèces de moisissures qui les contaminent appartiennent toujours aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*.

Les données concernant la contamination fongique de produits alimentaires à base de céréales ne sont pas nombreuses. En effet, les recherches sont, en général, orientées directement vers l'analyse de la présence de mycotoxines dans ces produits. De plus, la nature des procédés de fabrication implique souvent la réalisation de traitements thermiques suffisants pour détruire les spores fongiques présentes. Il peut néanmoins se poser la question de recontamination de ces produits après le traitement thermique et le développement des moisissures pendant le stockage.

Des espèces fongiques toxigènes ont été retrouvées dans des farines (Lugauskas *et al.*, 2006 ; Etcheverry *et al.*, 1999), dans le riz (Park *et al.*, 2005). Des investigations mycologiques effectuées au Nigeria (Adebajo *et al.*, 1994) ont démontré des niveaux de contaminations élevés dans des gâteaux de maïs. Les résultats disponibles sur la contamination fongique des produits alimentaires à base de céréales sont récapitulés dans le Tableau 10.

Tableau 10. Présence de moisissures dans les produits alimentaires à base de céréales.

Pays	Nature de l'aliment	Espèces fongiques identifiées	Fréquence de contamination (%)	Références
Argentine		<i>Fusarium spp</i>	68	Etcheverry, 1999
		<i>Aspergillus spp.</i>	35	
		<i>Aspergillus parasiticus</i>	38	
		<i>Penicillium spp.</i>	21	
Corée	riz raffiné	<i>Penicillium citrinum</i>	27	Park, 2005
		<i>Aspergillus versicolor</i>	26	
		<i>Aspergillus niger</i>	20	
		<i>Fusarium proliferatum</i>	16	
		<i>Fusarium oxysporum</i>	3	
		<i>Fusarium graminearum</i>	3	
		<i>Fusarium semitectum</i>	3	
Lituanie	farine de blé	<i>Penicillium expansum</i>	>40	Lugauskas, 2006
		<i>Penicillium viridicatum</i>		
		<i>Penicillium oxalicum</i>		
	farine de seigle	<i>Alternaria alternata</i>	>40	
		<i>Fusarium sporotrichioides</i>		
	farine de maïs	<i>Aspergillus spp.</i>	>50	
		<i>Aspergillus oryzae</i>		
		<i>Aspergillus versicolor</i>		
	farine d'orge	<i>Aspergillus flavus</i>	>50	
		<i>Penicillium expansum</i>		
<i>Penicillium verrucosum</i>				
<i>Penicillium variabile</i>				
<i>Fusarium poae</i>				
<i>Fusarium oxysporum</i>				
<i>Fusarium avenaceum</i>				
<i>Fusarium moniliforme</i>				
<i>Fusarium tricinctum</i>				
<i>Aspergillus fumigatus</i>				
<i>Penicillium Penicillium verrucosum</i>				
<i>Penicillium viridicatum</i>				
Nigeria	gâteaux de maïs	<i>Aspergillus spp.</i>	90	Adebajo, 1994
		<i>Penicillium spp.</i>	94	
		<i>Fusarium spp.</i>	88	

2.2.1.4- Autres végétaux

Les moisissures sont fréquemment retrouvées dans les céréales, mais elles peuvent aussi se développer sur d'autres végétaux destinés à l'alimentation humaine ou animale (légumes, fruits). En 2003-2004 en Lituanie, Lugauskas et al. a analysé la contamination mycologique de légumes nouvellement récoltés puis après stockage. Le but de l'étude était de détecter des espèces fongiques capables de synthétiser les métabolites toxiques. Des échantillons de

carottes, d'oignons et de choux ont été prélevés dans des entrepôts. *Penicillium expansum*, *P. nalgiovense* et *P. verrucosum* ont été retrouvés sur les carottes, *P. expansum* sur les oignons et *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium funiculosum* et *P. expansum* sur les choux. La fréquence de contamination des légumes était importante (Lugauskas *et al.*, 2005).

Le café est aussi un produit souvent contaminé par des moisissures ; les espèces fongiques retrouvées dans le café appartiennent principalement au genre *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. niger*, *A. flavus*). Des analyses mycologiques effectuées sur des échantillons de café vert montrent une contamination importante par des espèces d'*Aspergillus* : *A. niger* (83,3% des échantillons), *A. ochraceus* (53,3%) et *A. flavus* (25%) dans le café portugais et *A. ochraceus* (10%) et *A. niger* (22,9%) dans le café brésilien (Martins et Martins, 2003 ; Urbano *et al.*, 2001) (Tableau 11).

Tableau 11. Présence des espèces fongiques toxigènes dans les légumes.

Pays	Echantillons	Espèces fongiques identifiées	Fréquence de contamination (%)	Références
Lituanie	carotte	<i>Penicillium viridicatum</i>	100	Lugauskas, 2005
		<i>Penicillium nalgiovense</i>	67	
		<i>Fusarium oxysporum</i>	-	
	oignon	<i>Aspergillus spp.</i>	-	
		<i>Penicillium expansum</i>	22,22	
		<i>Penicillium jensenii</i>		
chou	<i>Aspergillus restrictus</i>	-		
	<i>Aspergillus niger</i>			
	<i>Penicillium expansum</i>	39,1		
<i>Penicillium funiculosum</i>				
<i>Penicillium cyclopium</i>				
Portugal	café	<i>Penicillium martensii</i>	-	Martins, 2003
		<i>Aspergillus niger</i>	-	
		<i>Fusarium avenaceum</i>	-	
		<i>Aspergillus niger</i>	83,3	
		<i>Aspergillus ochraceus</i>	53,3	
Brésil	café	<i>Aspergillus flavus</i>	25	Urbano, 2001
		<i>Penicillium spp.</i>	10	
		<i>Aspergillus ochraceus</i>	10,3	
		<i>Aspergillus niger</i>	22,9	

2.2.1.5- Produits affinés d'origine animale

Les moisissures participent directement au processus de fabrication de nombreux aliments transformés d'origine animale. Ainsi, il s'agit d'auxiliaires de fabrication indispensables à la

fabrication fromagère ainsi qu'à l'acquisition des qualités organoleptiques des produits de salaison sèche. Par conséquent, ces aliments représentent, par définition, un substrat favorable au développement fongique et posent donc un double problème en termes de santé publique :

- l'innocuité des souches fongiques utilisées en tant que ferment (absence de pouvoir toxigène notamment).
- le développement possible d'une flore contaminante potentiellement capable d'altérer le produit et/ou de produire des métabolites toxiques.

i) Le lait et les produits laitiers

Le lait est, en général, peu contaminé. En effet, les conditions de pasteurisation et/ou stérilisation, de conditionnement et de stockage ne permettent pas de contaminations ultérieures.

Les produits laitiers comme les yaourts ou les fromages sont, eux, beaucoup plus sensibles aux contaminations fongiques. Les espèces qui contaminent les yaourts et le lait en poudre appartiennent aux genres *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus* et *Rhizopus*.

Le beurre peut rancir, suite à une contamination par *Aspergillus repens* (Pfohl-Leszkowicz, 2001). Parfois les moisissures sont retrouvées dans les produits laitiers (Tableau 12).

Tableau 12. Présence des espèces fongiques toxigènes dans les produits laitiers.

Pays	Nature de l'aliment	Espèces fongiques identifiées	Fréquence de contamination (%)	Références
Italie	fromages	<i>Penicillium sp.</i> <i>Geotrichum sp.</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Mucor sp.</i>	72,9% 7,3% 4,2% 4,2%	Montagna, 2004
Norvege	Norvegia cheese Jarlsberg cheese	<i>Penicillium roqueforti</i> <i>P. commune</i> <i>P. palitans</i> <i>P. solitum</i>	99,1% 69,8%	Kure, 2001
Turquie	Kuflu cheese	<i>Penicillium commune</i> <i>P. roqueforti</i> <i>P. verrucosum</i> <i>P. expansum</i> <i>P. chrysogenum</i>	70.25%	Hayaloglu, 2007

ii) Les produits carnés

Les produits carnés séchés sont obtenus après un long processus de maturation. Les populations fongiques, qui se développent à leur surface, peuvent être essentielles au développement des qualités organoleptiques caractéristiques de ces produits. Le plus souvent, la flore fongique de ces aliments est complexe et comporte de nombreuses espèces, parmi lesquels on note souvent la présence d'espèces potentiellement toxigènes. Le problème est alors d'évaluer la conséquence possible d'un développement incontrôlé de ces espèces au cours de la période d'affinage, qui dure en général plusieurs semaines à plusieurs mois.

Les analyses mycologiques réalisées sur des échantillons de jambon Istrian produit dans le sud de la Croatie, ont mis en évidence la présence de 17 espèces fongiques appartenant aux genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Eurotium* et *Mucor*. Les espèces de *Penicillium*, *Aspergillus* et *Eurotium* représentaient plus de 97% d'espèces isolées (Comi *et al.*, 2004).

En Egypte, l'identification des moisissures présentes sur des tranches de viande de porc a montré la présence d'espèces appartenant aux genres *Aspergillus* (*A. flavus* et *A. niger*), *Penicillium* (*P. chrysogenum*), *Rhizopus* et *Mucor* (Izmail et Zaki, 1999).

En Espagne, l'identification de la flore fongique présente sur des produits carnés affinés a montré que les espèces fongiques présentes appartiennent en majorité au genre *Penicillium* (Lopez-Diaz *et al.*, 2001, Nunez *et al.*, 1996). Des micromycètes appartenant au genre *Aspergillus* (groupe *glaucus*) ont aussi été isolés sur le jambon sec salé (Hernandez et Huerta, 1993)

Les résultats des analyses fongiques réalisées sur des produits carnés affinés sont répertoriés dans le Tableau 13.

Par conséquent, les moisissures sont des microorganismes ubiquistes, peu exigeants quant à leur environnement et capables de se développer dans une large gamme de conditions environnementales et sur de nombreux substrats.

Le développement incontrôlé de ces contaminants peut entraîner une altération de l'aspect des aliments et en modifier la qualité organoleptique. Dans certaines conditions, ce développement fongique peut aussi conduire à la production et à l'accumulation dans les aliments de métabolites secondaires zootoxiques: les mycotoxines.

Tableau 13. Espèces fongiques présentes dans les produits carnés.

Pays	Produit	Espèces fongiques identifiées	Références
Croatie	Jambon Istrien	<i>Penicillium frequentans</i>	Comi, 2004
		<i>Penicillium verrocosum</i>	
		<i>Penicillium lanoso-coeruleum</i>	
		<i>Penicillium lanoso-griseum</i>	
		<i>Penicillium citrinum</i>	
		<i>Penicillium chrysogenum</i>	
		<i>Penicillium commune</i>	
		<i>Penicillium expansum</i>	
Egypte	Viande de porc	<i>Aspergillus flavus</i>	Izmail, 1999
		<i>Aspergillus niger</i>	
		<i>Penicillium chrysogenum</i>	
		<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	
		<i>Penicillium oxalicum</i>	
		<i>Rhizopus stolonifer</i>	
		<i>Mucor circineloides</i>	
		<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	
Espagne	Saucisson	<i>Penicillium nalgiovense</i>	Lopez-Diaz, 2001
		<i>Penicillium olsonii</i>	
		<i>Penicillium commune</i>	
	Jambon Ibérien	<i>Penicillium commune</i>	Nunez, 1996
		<i>Penicillium chrysogenum</i>	
		<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	
		<i>Penicillium expansum</i>	
		<i>Penicillium echinulatum</i>	
	Jambon sec salé	<i>Eurotium herbariorum</i>	Hernandez, 1993
<i>Eurotium repens</i>			
		<i>Aspergillus</i> <i>groupe glaucus</i>	

3- Les mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques produits par certaines souches de moisissures dans les milieux où elles se développent, principalement dans les matières premières d'origine végétales (céréales, légumes, fruits). Plusieurs centaines de mycotoxines ont pu être identifiées et environ une trentaine de ces molécules a une véritable importance en termes de santé animale et humaine (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002).

3.1 Conditions de toxinogènese

La production de 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 toxinogènese. De 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.

3.1.1- Activité en eau (Aw)

L'activité hydrique nécessaire à la toxinogènese est supérieure à celle permettant la croissance fongique (Pfohl-Leszkowicz, 2001). Par exemple, *Penicillium verrucosum* peut se développer à partir d'une Aw de 0,80; par contre la production d'OTA n'est possible que lorsque l'Aw est $\geq 0,85$ (Cairns-Fuller *et al.*, 2005). De même, *Fusarium graminearum* peut se développer dans des substrats dont l'activité hydrique est de l'ordre de 0,93. La production de déoxynivalénol, elle, est importante pour des Aw de 0,995 (Ramirez *et al.*, 2006).

3.1.2- pH

Comme pour l'Aw, la gamme de pH permettant la toxinogènese est plus restreinte que celle permettant la croissance fongique. En 1997 Keller a caractérisé l'effet du pH sur la croissance de *Fusarium proliferatum* et, en parallèle, sur la production de fumonisine B1. Les résultats sont présentés dans le Tableau 14.

Tableau 14. Influence de pH sur la production de fumonisine B1 par *Fusarium proliferatum*.

Keller, 1997

pH	Fumonisine B1 (ppm)
2,2	9,4 ± 4,5
2,6	33,3 ± 10,2
3,0	261,6 ± 38,1
3,7	436,7 ± 118,0
4,2	432,3 ± 66,9
5,6	16,9 ± 9,2

3.1.3- Présence d'oxygène

Généralement la production des mycotoxines est plus sensible à la variation de composition de l'air que la croissance fongique. Une concentration en oxygène inférieure à 1% et des concentrations élevées de CO₂ empêchent l'élaboration de mycotoxines (Cairns-Fuller *et al.*, 2005; Keller *et al.*, 1997).

3.1.4- Température

La température optimale pour l'élaboration de mycotoxines est généralement proche de la température optimale de croissance, mais, le plus souvent, légèrement inférieure. C'est notamment le cas pour l'élaboration des aflatoxines (*Aspergillus flavus*), de l'ochratoxine A (*A. ochraceus*), de la stérigmatocystine (*A. versicolor*), de la patuline (*Penicillium granulatum*), de l'acide pénicillique et de l'acide cyclopiazonique (*Penicillium granulatum*) (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

La température optimale pour la croissance de *Fusarium graminearum* est de 25°C, mais la synthèse de la zéaralénone peut avoir lieu à 15°C.

La température peut aussi influencer la proportion de toxines produites par une souche susceptible de synthétiser plusieurs molécules. Par exemple, *Fusarium graminearum* (Tableau 15) peut produire préférentiellement de la zéaralénone à 25°C, alors que c'est le déoxynivalenol qui sera majoritairement produit à 28°C (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

Tableau 15. Influence de la température sur l'élaboration de zéaralénone et de déoxynivalénol par *Fusarium graminearum*.

Pfohl-Leszkowicz, 2001

Température	Concentration en ppm	
	zéaralénone	déoxynivalénol
19,5	57,7 ± 7	6,1 ± 0,6
25	120 ± 13	149 ± 14
28	98 ± 34	365 ± 15

3.1.5- Composition du substrat

La composition qualitative et quantitative des substances nutritives (des glucides, principalement) peut influencer la production de mycotoxines. La présence de certaines molécules dans le substrat peut aussi influencer la production de mycotoxines. Ainsi, l'acide phytique diminue la synthèse d'aflatoxine par *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus* alors que la proline stimule cette production. De même, la proline et l'acide glutamique stimulent la synthèse d'ochratoxine A par *Aspergillus ochraceus* (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

3.1.6- 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-Leszkowicz, 2001).

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

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* diminuent la production de cette mycotoxine (Mislivec *et al.*, 1988). Dans le même esprit, la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* est inhibée par la présence d'*Aspergillus niger* (Horn et Wicklow, 1983).

3.2- Nature et origine des mycotoxines

La formation de métabolites toxiques dans un substrat à la suite de leur attaque par des moisissures peut être le résultat de trois mécanismes différents :

1 - Le champignon, en parasitant un végétal vivant, peut entraîner, soit une exacerbation de certaines réactions métaboliques de la plante, conduisant à des concentrations anormalement élevées d'un constituant habituel, soit la formation par le végétal de produits toxiques n'existant pas dans la plante saine.

2 - Le champignon peut transformer un composé peu ou pas toxique en un produit toxique par le jeu des bioconversions. Ainsi, l'acide coumarique, présent en faible concentration peut être transformé par différentes moisissures en 4-hydroxycoumarine, puis en dicoumarol, anticoagulant puissant.

3 - La toxine est un métabolite propre de champignon: aflatoxine, zéaralénone (Le Bars, 1988)

3.2.1- Biogénèse des mycotoxines

Les mycotoxines font partie des métabolites secondaires, qui ne jouent pas de rôle évident dans l'économie du microorganisme. 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. Le métabolisme secondaire, très important chez les moisissures, aboutit à une grande diversité de molécules, dont les mycotoxines.

Les métabolites secondaires sont très souvent élaborés par familles de produits chimiquement voisins (les aflatoxines, les trichothécènes, etc.). La nature de ces produits, très hétérogènes, dépend des caractères individuels de la souche et des conditions environnementales.

Les voies de biosynthèse sont longues et complexes et les réactions sont catalysées par des enzymes de spécificité différente de celles du métabolisme primaire. La détermination des schémas métaboliques de biosynthèse de certaines mycotoxines a été rendu possible grâce à l'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques et de précurseurs métaboliques (Luchese et Harrigan, 1993 ; Steyn, 1980).

Les mycotoxines ont trois origines biosynthétiques principales : la voie des polyacétates, celle des terpènes et celle des acides aminés. Les principales voies connues de biosynthèse des mycotoxines sont présentées dans la Figure 17.

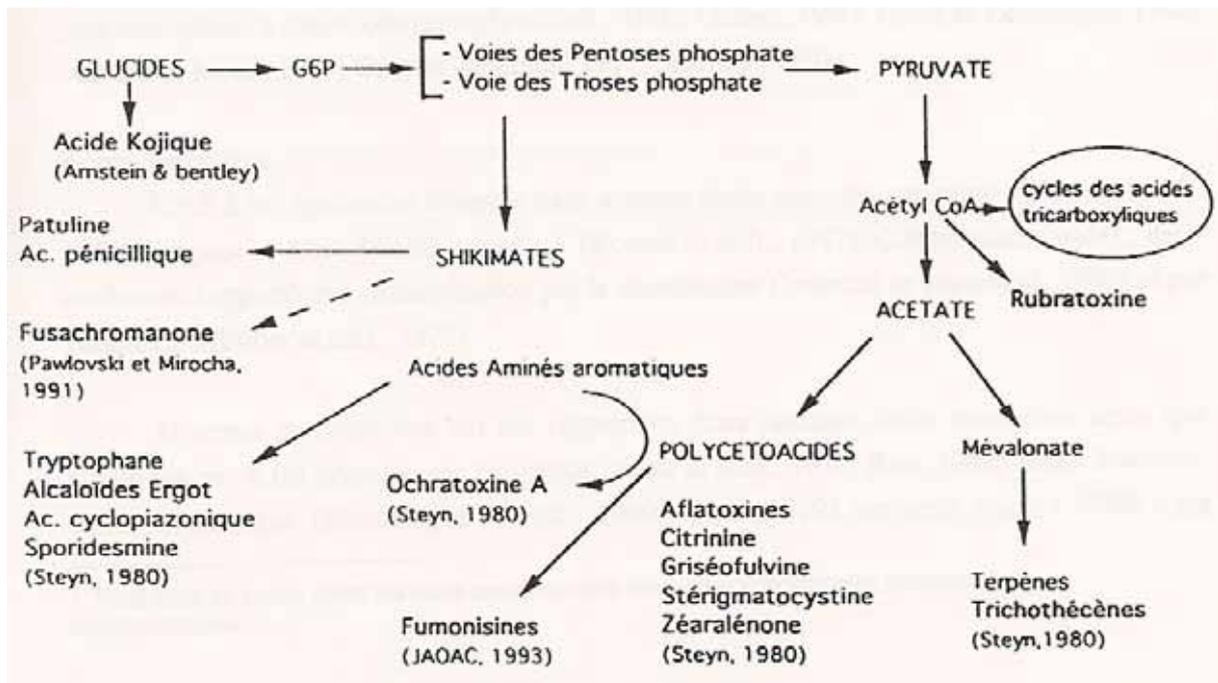


Figure 17. Voies de biosynthèse des mycotoxines.

3.2.2- Structure des mycotoxines

La diversité des voies de synthèse et des espèces productrices fait qu'il existe de très nombreuses molécules, de structure relativement différentes les unes des autres (voir plus loin).

Le plus souvent, les mycotoxines sont de molécules de faible poids moléculaire: de 154 D pour la patuline qui est l'une des plus petites, à 466 D pour la toxine T2 qui est l'une des plus grosses.

Les mycotoxines sont, pour la plupart, des composés hétérocycliques insaturés. La présence de doubles liaisons C = C joue souvent un rôle dans la toxicité et les propriétés cancérogènes. C'est notamment le cas pour les aflatoxines dont la double liaison à l'extrémité des groupements furanes permet l'addition d'O₂ et la formation d'un cycle triangulaire époxyde extrêmement toxique (Bennett et Klich, 2003). Pour le DON et la toxine T2 qui sont des 12-13 époxytrichothécènes, le cycle époxyde est constitutif.

Un certain nombre de ces molécules sont fluorescentes sous lumière U.V. (aflatoxines B1, B2 et G1, G2, ochratoxine A, zéaralénone,...). Cette caractéristique est importante dans l'élaboration des méthodes de détection et de dosage.

3.3- Les principales mycotoxines

Les principales mycotoxines peuvent être produites par 5 types de champignons : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria*. Compte tenu de leurs propriétés toxiques chez l'homme et l'animal et de leur fréquence de contamination des matières premières et des aliments, les mycotoxines les plus importantes sont les aflatoxines, l'ochratoxine A, les fumonisines, les trichothécènes et la zéaralénone.

3.3.1- Les aflatoxines

Trois espèces d'*Aspergillus* sont connues pour leur capacité à synthétiser des aflatoxines. *A. flavus* produit principalement l'aflatoxine B₁ et l'aflatoxine B₂, *A. parasiticus*, produit les 4 aflatoxines (B₁ ; B₂, G₁, G₂) et *A. nomius*, une souche rare, proche de *A. flavus*, est capable de produire des aflatoxines (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002). Les conditions les plus favorables à la production d'aflatoxines sont une activité en eau relativement faible (0,84 - 0,86) et une température élevée, comprise entre 25 et 40 °C (Pfohl-Leszkowicz, 2001; Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002).

La famille des aflatoxines compte 13 substances. Les principales aflatoxines sont présentées dans le Tableau 16.

3.3.1.1- Contamination des aliments

Compte tenu de leurs conditions de synthèse, les aflatoxines sont généralement trouvées dans des aliments en provenance de régions chaudes et humides (Amérique de Sud, Afrique, Asie). Elles ont été détectées dans les céréales (maïs, blé, orge, avoine, seigle, riz) et les produits à base de céréales, des oléagineux (soja), des noix et leurs dérivés (arachides, beurre d'arachide, pistache), des légumes (pommes de terre, lentilles, piments) et fruits secs (figues) et bière. Dans le Tableau 17 sont présentées quelques données concernant la contamination des aliments par les aflatoxines dans le monde.

Tableau 16. Les principaux représentants de famille d'aflatoxines.

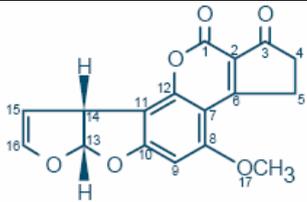
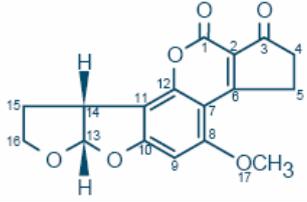
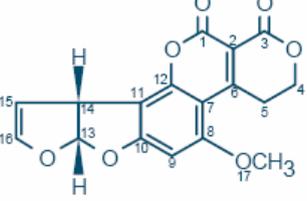
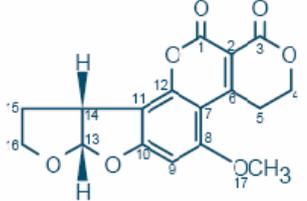
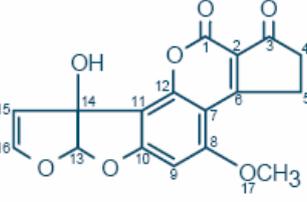
Dénomination	Formule brute	Structure	Masse moléculaire g/mol
Aflatoxine B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	 <p>The structure of Aflatoxine B1 consists of a difuran ring system (atoms 12-16) fused to a coumarin ring system (atoms 1-11). The coumarin ring has a methoxy group (-OCH₃) at position 8 (atom 17) and carbonyl groups at positions 1 and 3. The difuran ring has a double bond between atoms 14 and 15, and a hydrogen atom at atom 14.</p>	312,3
Aflatoxine B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	 <p>The structure of Aflatoxine B2 is similar to Aflatoxine B1, but with an additional hydrogen atom at position 14 of the difuran ring, making it saturated.</p>	314,3
Aflatoxine G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	 <p>The structure of Aflatoxine G1 is similar to Aflatoxine B1, but with an additional oxygen atom at position 4 of the coumarin ring, forming a lactone ring.</p>	328,3
Aflatoxine G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	 <p>The structure of Aflatoxine G2 is similar to Aflatoxine G1, but with an additional hydrogen atom at position 14 of the difuran ring, making it saturated.</p>	330,3
Aflatoxine M1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	 <p>The structure of Aflatoxine M1 is similar to Aflatoxine G1, but with a hydroxyl group (-OH) at position 14 of the difuran ring instead of a hydrogen atom.</p>	328,3

Tableau 17. Présence des aflatoxines dans des matières premières et des produits d'origine végétale pour différents pays.

Pays	Produit	Toxine	Niveau de contamination (µg/kg)	Références
Céréales				
Argentine	maïs	AFB1 AFB2	50 30	Nepote, 1997
Bostwana	sorgho	aflatoxines totales	0,3	Siame, 1998
Brésil	maïs	AFB1	0,2-129	Vargas, 2001
		AFB1+AFG1	12-906	Hennigen, 1995
		AFB2 AFG2	48-180 6-11	
Corée	riz	AFB1	4,3	Park, 2005
Etats Unis	maïs	aflatoxines totales	0-35	Abbas, 2002
Ethiopie	blé orge sorgho	AFB1	26	Ayalew, 2006
France	maïs	AFB1	4-34	Garon, 2006
Grand Bretagne	riz	AFB1	28	Scudamore, 1998b
Inde	maïs	AFB1	0-26,8	Janardhana, 1999
Indonesie	maïs	aflatoxines totales	119	Ali, 1998
Kenya	maïs	AFB1	52.91	Lewis, 2005
Nigeria	maïs	AFB1	22	Bankole, 2004
Pologne	avoine blé maïs orge seigle	aflatoxines totales	5-1140	Juskiewicz, 1992
Turquie	avoine blé maïs orge seigle	aflatoxines totales	0.03-3.16	Baydar, 2005
	soja	AFB1	0,94	
Vietnam	maïs	AFB1	28	Wang, 1995
Aliments composée pour les animaux				
Argentine	AC volailles	AFB1	17-197	Dalcero, 1997
			10-123	Dalcero, 1998
	AC volailles	AFB1	181-14545	Magnoli, 1998
		AFB2	6-3640	
Brésil	AC volailles	AFB1	1,2-17,5	Oliveira, 2006a
Aliments d'origine végétale destinés à l'alimentation humaine				
Argentine	polenta corn flakes	aflatoxines totales	>2	Solovey, 1999
Afrique de Sud	maïs malt sorgho pour bière	aflatoxines totales	200-400	Odhav, 2002
Bostwana	arachide beurre d'arachide	aflatoxines totales	0,1-64	Siame, 1998
Quatar	pistache piment (chilli) arachides figes sèches	AFB1	0,23-81,64	Abdulkadar, 2004
			5,60-69,28	
			0,17-2,13	
			0,7-11,8	
Turquie	pommes de terre	AFB1	0,11	Baydar, 2005
	lentilles		0,57	
	noisettes (crème) abricots séchés	AFB1	1,07 1,44	Günsen, 2002

L'aflatoxine B1 présente dans les aliments ingérés par des vaches laitières est partiellement métabolisée au niveau hépatique et transformée en son dérivé 4-hydroxy, connu sous le nom d'aflatoxine M1 qui est excrétée dans le lait. Cette molécule est stable et peut ensuite être retrouvée dans les produits à base de lait (yaourts, fromages). Le Tableau 18 présente quelques données concernant la présence de l'aflatoxine M₁ dans le lait et les produits laitiers.

Tableau 18. Présence de l'aflatoxine M₁ dans le lait et les produits laitiers

Pays	Nature des échantillons	Contamination en AFM1 (ng/l)	Références
Lait			
Brésil	lait cru	73-370	de Sylos, 1996
	lait UHT lait pasteurisé	50-240	Garrido, 2003
	lait UHT	11-251	Oliveira, 2006b
Colombie	lait cru	10,6- 288,9	Diaz, 2006
Corée	lait pasteurisé	18	Kim, 2000
	lait en poudre	200	
	lait pour les nourrissons	46	
Espagne	lait cru	10-80	Rodriguez-Velasco, 2003
Grèce	lait pasteurisé	< 50	Roussi, 2002
	lait UHT		
	lait concentré		
Italie	lait cru	2-108	Bognano, 2006
	lait cru	1-23,5	Galvano, 2001
Japon	lait pasteurisé	1-29	Nakajima, 2004
Kuwait	lait frais	0,21	Srivastava, 2001
Libye	lait cru	0,03-3,13	Elgerbi, 2004
Maroc	lait pasteurisé	1-117	Zinedine, 2007a
Mexique	lait cru	0-8350	Carvajal, 2003
Portugal	lait cru	5-50	Martins, 2000
	lait UHT	21-50	
Turquie	lait cru	< 50	Oruc, 2001
	lait UHT	108.17	Unusan, 2006
Produits laitiers			
Corée	yaourt	29	Kim, 2000
Italie	fromage	5-250	Peitri, 1997
	yaourt	1-32,1	Galvano, 2001
Portugal	Yaourt	44	Martins, 2004
	Yaourt +fraises	51,12	
Turquie	fromage	810	Oruc, 2001
	fromage	142,2	Günsen, 2002

3.3.1.2- Effets toxiques d'aflatoxines

Les effets des aflatoxines sur la santé animale varient suivant l'espèce, l'âge, le sexe, l'état physiologique de l'animal, le mode d'administration, la composition de l'alimentation.

L'AFB₁ est la plus toxique suivie, par ordre décroissant de toxicité, par l'AFM₁, l'AFG₁, l'AFB₂ et l'AFG₂. La toxicité des aflatoxines G₁, B₂ et G₂ sont respectivement 50, 80 et 90 % moindre que celle de l'AFB₁ (Cole et Cox, 1981).

Ingérée en grande quantité, l'aflatoxine peut être responsable de toxicités aiguës. Elle se caractérise généralement par la mort rapide des animaux. Ils présentent alors un foie décoloré et augmenté de volume (hépatotoxicité) ; les reins présentent des signes de glomérulonéphrite et les poumons sont congestionnés.

Les aflatoxines sont tératogènes (Arora *et al.*, 1981). L'effet tératogène est bien décrit chez les embryons de poulet pour lesquels on note un retard de développement, une microcéphalie, une anophthalmie, un palais fendu (bec de lièvre) et une déformation des maxillaires (Vesely *et al.*, 1983).

Toutefois, la propriété toxique majeure de l'AFB₁ est son pouvoir cancérigène. En effet, cette molécule est responsable de l'apparition d'hépatocarcinomes chez les hommes et les animaux. Pour cette raison, elle est classée dans le groupe I des molécules cancérigènes chez l'homme par le IARC (Autrup *et al.*, 1991; Vainio *et al.*, 1992).

3.3.2- L'ochratoxine A

La famille des ochratoxines comprend une dizaine de molécules connues, mais l'ochratoxine A est le représentant le plus important. L'ochratoxine A ou OTA (Figure 18) est produite par des espèces d'*Aspergillus* (*A. ochraceus*) et de *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. viridicatum*) ce qui en fait un contaminant pouvant être produit dans des conditions assez variables. En effet, la température optimale de production de l'OTA par l'*Aspergillus ochraceus* est de 28 °C, cette production étant fortement réduite à 15 °C ou 37 °C. Au contraire, *Penicillium viridicatum* se développe et peut produire de l'OTA dans une gamme de températures qui varie de 4 à 30 °C. Dans les régions froides, l'OTA est donc plutôt produite par des *Penicillium*, alors que dans les régions chaudes, ce sont plutôt les *Aspergillus* qui la synthétisent (Pohland *et al.*, 1992 ; Varga *et al.*, 1996).

Formule brute: C₂₀H₁₈ClNO₆.
Masse moléculaire : 403,8 g/mol

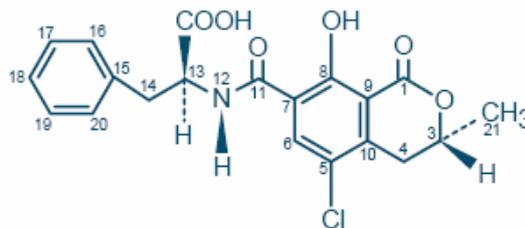


Figure 18. L'ochratoxine A.

3.3.2.1- Contamination des aliments

L'ochratoxine A est retrouvée essentiellement dans les céréales (blé, maïs, seigle, orge, avoine...), mais aussi dans le riz, le soja, le café, le cacao, les haricots, les pois, les cacahuètes et les fruits secs (figues, raisins). Elle est présente aussi dans les produits dérivés des céréales comme la farine, le pain, les pâtes (Majerus *et al.*, 1993), dans la bière (El-Dessouki, 1992) et même dans le vin et les jus de raisin (Zimerli et Dick, 1996).

Contrairement aux aflatoxines, retrouvée plus souvent dans des céréales issus des régions chaudes, l'ochratoxine A est retrouvée dans les céréales de toutes les régions car elle peut être produite par l'*Aspergillus ochraceus* dans les régions chaudes et par les *Penicillium* dans les climats tempérés (Tableau 19).

L'ochratoxine A, se retrouve dans les aliments composés pour les animaux, conséquence d'utilisation de matières premières contaminées ou de mauvaises conditions de stockage. Cette mycotoxine a été retrouvée à des niveaux pouvant atteindre 30 µg/kg dans les aliments composés pour les porcs (Dalcero *et al.*, 2002) et jusqu'à 25 µg/kg dans les aliments composés pour les porcs, les volailles et les lapins produits en Argentine (Magnoli *et al.*, 1998).

Les produits alimentaires à base de céréales contiennent parfois de l'ochratoxine A ; les quantités retrouvées sont en générale faibles (Ngundi *et al.*, 2006). Les *Aspergillus* et les *Penicillium* prolifèrent le plus souvent en surface des grains et une grande quantité de mycotoxine est éliminée pendant les processus technologiques.

**Tableau 19. Présence de l'ochratoxine A dans les grains de céréales
pour différents pays.**

Pays	Echantillon	Niveau de contamination (µg/kg)	Références
Corée	riz	3,9	Park, 2005
Côte d'Ivoire	millet	3-1738	Sangare-Tigori, 2006
	maïs	9-92	
	riz	0,6-64	
Croatie	maïs	1,47	Domijan, 2005
Ethiopie	blé orge sorgho	54,1	Ayalew, 2006
Etats Unis	blé	60	Ngundi, 2006
	orge	85	
Grand Bretagne	maïs	2	Scudamore, 1998a
	riz	3-12	Scudamore, 1998b
	maïs	1,5	Scudamore, 2000
	blé orge avoine	5,2-231	MacDonald, 2004
Houngarie	blé	0,3-62,8	Fazekas, 2002
	maïs	1,9-8,3	
	orge	0,14-212	
Inde	maïs	0-20	Janardhana, 1999
Italie	blé	0-4,07	Castoria, 2005
Lituanie	blé	1,77-3,19	Baliukoniene, 2003
	orge	0,37-0,92	
Maroc	riz	0,02-32,4	Zinedine, 2007
Pologne	blé	0,5	Krysinska-Traczyk, 2001
Portugal	riz	0,09-3,52	Pena, 2005
Russie	blé, seigle, orge, avoine	200-33300	Aksenov, 2006
Turquie	blé	0,36-2,23	Baydar, 2005
	maïs	0,47	
	riz	0,27	
	soja	0,57	
	avoine	4,07	
	seigle	3,69	
	orge	3,45	

Les figues et raisins secs (Zinedine *et al.*, 2007b ; Tjamos *et al.*, 2006), les arachides (Zinedine *et al.*, 2007b), le café (Fujii *et al.*, 2006 ; Fazekas *et al.*, 2002; Robledo *et al.*, 2001) sont souvent contaminés par l'ochratoxine A. On trouve aussi des petites quantités de cette mycotoxine dans les pommes de terre et les lentilles (Baydar *et al.*, 2005). Ces données de contamination sont présentées dans le Tableau.20.

Tableau 20. Présence de l'ochratoxine A dans des produits végétaux

Pays	Produit	Niveau de contamination (µg/kg)	Références
Brésil	café	0,84-7,3	Fujii, 2006
Grèce	raisins	16-25	Tjamos, 2006
Houngarie	café	0,17-1,3	Fazekas, 2002
Maroc	figues séchs	0,01-1,42	Zinedine, 2007b
	raisins séchs	0,05-4,95	
	arachides	0,1-2,36	
Mexique	café vert	30,1	Robledo, 2001
Portugal	café	0,2-7,3	Martins, 2003
Tunisie	raisins	0,59-2,57	Lasram, 2007
Turquie	pommes de terre	0,32	Baydar, 2005
	lentilles	0,83	

L'ochratoxine A a aussi pu être retrouvée dans les abats et les viandes d'animaux recevant des aliments contaminés (Jorgensen, 1998). Elle a été mise en évidence dans le sang et les tissus des animaux d'élevage où elle s'accumule au niveau rénal et hépatique (Terplan et Wenzel, 1993 ; Mac Donald *et al.*, 1993 ; Gareis, 1996).

3.3.2.2- Effets toxiques de l'ochratoxine

L'organe cible pour l'OTA est le rein. (Pohland *et al.*, 1992 ; Marquardt et Fröhlich, 1992). Toutefois, la toxicité de cette mycotoxine peut varier en fonction de l'espèce, du sexe, de la voie d'administration. Di Paolo et coll. (1993) ont décrit un cas d'intoxication aiguë par inhalation d'*Aspergillus ochraceus*, ayant provoqué une atteinte rénale (oligurie et tubulonécrose) (Pohland *et al.*, 1992; Marquardt et Frohlich, 1992). L'OTA est aussi très facilement et rapidement absorbée par le tractus respiratoire (Breitholz-Emanuelsson *et al.*, 1995).

L'OTA est potentiellement néphrotoxique chez toutes les espèces testées, à l'exception des ruminants adultes (Ribelin *et al.*, 1978). Des études effectuées au Danemark, en Hongrie, en Scandinavie et en Pologne, ont montré que l'OTA peut jouer un rôle majeur dans l'étiologie de la néphropathie porcine. Des lésions rénales chez le poulet ont aussi été associées à l'ingestion de cette mycotoxine (Hamilton *et al.*, 1982).

L'OTA administrée à divers animaux provoque des effets variables au niveau de la moelle osseuse et de la réponse immunitaire. Elle peut être à l'origine de lymphopénie, de régression

du thymus et de suppression de la réponse immunitaire (Singh *et al.*, 1990, Lea *et al.*, (1989, Luster *et al.*, 1987).

L'OTA est tératogène chez l'animal. Elle provoque des anomalies morphologiques diverses chez le rat, la souris, le hamster, le porc et les embryons de poulet. Celles ci incluent : une mortalité fœtale augmentée, des malformations fœtales, une perte de poids des fœtus, une proportion anormale de fœtus présentant des hémorragies, une réduction de la taille des portées et des retards de croissance, anomalies des viscères et du squelette (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

Chez l'homme, l'OTA est suspecte d'être impliquée dans la néphropathie endémique des Balkans (Abouziéd *et al.*, 2002 ; Vrabceva *et al.*, 2000 ; Vrabceva *et al.*, 2004). Elle est classée dans le groupe 2B des molécules cancérigènes chez l'animal est possiblement cancérigènes chez l'homme (Vainio *et al.*, 1992).

3.3.3- Les fumonisines

Les fumonisines sont un groupe de mycotoxines caractérisées à la fin des années 80 et produites par *Fusarium verticilloides*, une moisissure présente dans le monde entier et fréquemment retrouvée sur le maïs. Plusieurs souches de *F. verticilloides* isolées d'autres substrats comme le sorgho (Ayalew *et al.*, 2006) et l'avoine (Sugita-Konishi *et al.*, 2006) produisent des quantités importantes de fumonisines.

Ces toxines peuvent aussi être produites par *F. proliferatum* (Norred *et al.*, 1992) et *F. nygamai* qui parasite principalement le sorgho et le millet (Nelson *et al.*, 1992). On a aussi montré que les fumonisines peuvent être élaborées par *F. oxysporum* (Abbas *et al.*, 1995a) et *F. polyphialidicum* (Abbas et Ocamb, 1995) ; *A. alternata sp. Lycopersi* peut synthétiser aussi des fumonisines (Abbas *et al.*, 1997).

Aujourd'hui la famille des fumonisines comprend 15 molécules différentes. Les fumonisines B1, B2 et B3 (Figure 19) sont les plus répandues dans le monde comme des contaminants naturels des céréales. Les principales fumonisines sont présentés dans le Tableau 21.

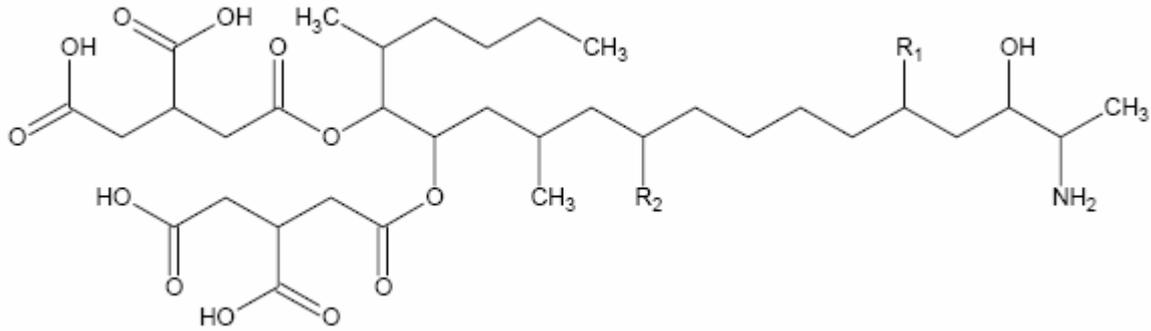


Figure 19. Structure générale des fumonisines.

Tableau 21. Les principales fumonisines.

Denomination	R1	R2	Formule brute	Masse moléculaire
Fumonisine B1	OH	OH	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	721,838
Fumonisine B2	OH	H	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705,839
Fumonisine B3	H	OH	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705,839
Fumonisine B4	H	H	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₃	689,840

Les *Fusarium* sont des champignons endophytes qui colonisent la plante en croissance sans aucun signe visible. Ils peuvent infester les racines, les jeunes feuilles et les parties végétatives ou directement les grains. Les épis de maïs peuvent contenir de fortes teneurs en fumonisines sans aucune altération macroscopique.

3.3.3.1- Contamination des aliments

Les fumonisines sont des contaminants très fréquents des aliments à base de maïs en Afrique, en Chine, en France, en Indonésie, en Italie, en Amérique du Sud, en Thaïlande et aux Etats-Unis. Les niveaux de contamination observés sont parfois très importants: 3600-11600 µg FB1/kg de maïs au Kenya (Kedera *et al.*, 1999) et 2117 µg FB1/kg dans le sorgho en Ethiopie (Ayalew *et al.*, 2006), 6100 µg FB1/kg dans le maïs au Brésil (Vargas *et al.*, 2001), 18500 µg FB1/kg dans du maïs en Corée (Ah Seo et Lee, 1999), ce maïs contenant aussi de la Fumonisine B2 (5600 µg/kg) et de la fumonisine FB3 (2500 µg/kg). Par comparaison, le maïs produit en Europe présente des niveaux de contamination plus faibles (Arino *et al.*, 2007). Ces données de contamination sont répertoriées dans le Tableau 22.

Tableau 22. Présence de fumonisines dans des céréales pour différents pays.

Pays	Echantillon	Fumonisines	Niveau de contamination (µg/kg)	Références
Bostwana	maïs	FB1	20-1270	Siame, 1998
Brésil	maïs	FB1	200-6100	Vargas, 2001
Corée	maïs	FB1	23,2	Sohn, 1999
		FB2	7,5	
		FB3	6,3	
	maïs	FB1	18500	Ah Seo, 1999
	FB2	5600		
	FB3	2500		
	riz	FB1	54,4	Park, 2005
Croatie	maïs	FB1	459,5	Domijan, 2005
Espagne	maïs	FB1	43	Arino, 2007
		FB2	22	
Etats Unis	maïs	fumonisines totales	140-609	Abbas, 2002
Ethiopie	sorgho	fumonisines totales	2117	Ayalew, 2006
Grand Bretagne	maïs	FB1	8-32	Scudamore, 1998b
Indonésie	maïs	FB1	855	Ali, 1998
Italie	blé	FB1	0-70	Castoria, 2005
Japon	maïs avoine	FB1	354	Sugita-Konishi, 2006
		FB2	94	
		FB3	64	
Kenya	maïs	FB1	3600-11600	Kedera, 1999
Mexique	maïs	FB1	2541	Robledo, 2001
Nigérie	maïs	FB1	70-1780	Bankole, 2004
Thaïlande	maïs	FB1	1790	Yoshizawa, 1996
		FB2	251	

Les fumonisines sont essentiellement présentes dans les aliments à base de maïs destinés aux hommes ou aux animaux. En Italie des quantités importantes de fumonisines se retrouvent dans les produits de panification ; les échantillons de pain, pâtes, biscuits, céréales pour le petit déjeuner, analysés contenaient de la fumonisine B1 entre 10 et 2870 µg/kg et de la fumonisine B2 entre 10 et 790 µg/kg (Cirillio *et al.*, 2003). Plus récemment, une étude effectuée sur les aliments à base de céréale pour les enfants, en Russie, a démontré une importante contamination ; les échantillons analysés présentaient en effet un taux de FB1+FB2 allant de 10 à 9200 µg/kg (Sedova et Tutelyan, 2006). Ces données sont répertoriées dans le Tableau 23.

Tableau 23. Présence de fumonisines dans des produits à base de céréales.

Pays	Echantillon	Fumonisines	Concentration (µg/kg)	References
Argentine	farine de maïs corn flakes	FB1 FB2 FB3	60-2860 61-1090 18-1015	Solovey, 1999
Brésil	farine de maïs produits à base de maïs	FB1 FB2 FB3	2242 437	de Castro, 2004
Italie	pain, pâtes, biscuits, céréals petit déjeuner	FB1 FB2	10-2870 10-790	Cirillo, 2003
Russie	produits à base de céréales produits à base de céréales et lait	FB1+FB2	30-4350 10-9200	Sedova, 2006

3.3.3.2- Effets toxiques des fumonisines

La toxicité des fumonisines est caractérisée par l'apparition de signes cliniques très différents en fonction des espèces. Chez les équins, la fumonisine est responsable, d'une maladie connue sous la dénomination de : *Equine LeukoEncephaloMalacia* (ELEM) qui se traduit par une liquéfaction de la substance blanche cérébrale (Bailly *et al.*, 1996). En plus des lésions au niveau cérébral, des anomalies histopathologiques du foie et des reins apparaissent chez des chevaux ayant ingéré de la FB₁ pure ou du maïs naturellement contaminé (Ross *et al.*, 1993 ; Wilson *et al.*, 1992).

Les porcins nourris avec des cultures de *F. verticilloides* développent un œdème pulmonaire (Osweiler *et al.*, 1992 ; Ross *et al.*, 1992). Les doses plus faibles engendrent des hépatotoxicoses aiguës (Osweiler *et al.*, 1992 ; Colvin *et al.*, 1993). La FB₁ provoque aussi des altérations morpho-physiologiques au niveau du pancréas, du cœur, des reins, de l'œsophage et de l'endothélium alvéolaire. Les expériences effectuées par Becker *et al.* (1995), montrent que la FB₁ ne se transmet pas dans le lait et n'affecte donc pas les porcelets.

Les volailles sont beaucoup plus résistantes à la FB₁. Cette molécule n'entraîne en général qu'une perte de poids et des diarrhées à forte dose (Bucci et Howard, 1996). D'après Bucci et Howard (1996), la fumonisine B₁ ne passe pas dans les œufs.

Lebepe-Mazur *et al.* (1995) ont montré que la FB₁ affecte les fœtus chez les rattes. On note une diminution du poids des petits et des malformations fœtales (Lepede-Mazur *et al.*, 1995 ; Floss *et al.*, 1994 a et b). Ces molécules sont aussi immunotoxiques et diminuent la

prolifération lymphocytaire ainsi que la synthèse de certaines immunoglobulines (Osweiler *et al.*, 1993, Rotter *et al.*, 1996 ; Martinova et Merrill, 1995).

L'administration prolongée de FB1 à des rongeurs de laboratoire entraîne l'apparition de tumeurs hépatiques (Gelderblom *et al.*, 2001). Chez l'homme, la FB1 est suspecte d'être impliquée dans la forte prévalence des cancers de l'œsophage observée dans certains pays comme en Afrique du Sud et en Chine (Luo *et al.*, 1990 ; Yoshizawa *et al.*, 1994). Pour ces raisons, la FB1 est classée dans le groupe 2B des molécules cancérigènes chez l'animal et potentiellement cancérigènes chez l'homme (IARC, 2000).

3.3.4- Les trichothécènes

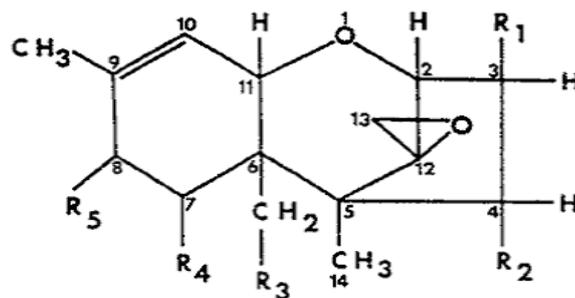
Le groupe des trichothécènes compte approximativement 60 molécules biologiquement actives. Les trichothécènes sont produites, principalement, par des espèces de genre *Fusarium* qui contaminent les céréales, particulièrement le maïs. Des trichothécènes peuvent aussi être produites par des espèces appartenant aux genres *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Stachybotrys*.

Les trichothécènes appartiennent au groupe des sesquiterpénoïdes. Ils possèdent un squelette tricyclique formé par un cyclopentane, un cyclohexane, un cycle à six chaînons oxygénés et quatre groupements méthyles. Ce squelette est appelé trichothécane. Tous les trichothécènes naturels possèdent une double liaison (ou pont oléfinique) en C9, 10 ainsi qu'un groupement époxy en C12,13 caractéristique des 12,13 époxy-trichothécènes.

On classe les trichothécènes en 4 groupes, les groupes A et B (figure 4) étant les plus importants en termes de prévalence naturelle :

- **Groupe A** : constitué par les trichothécènes qui n'ont pas de fonction cétone en C8. Les plus importants sont la toxine T-2, la toxine HT-2 et le diacétoxyscirpénol (DAS) ;
- **Groupe B** : constitué par les trichothécènes ayant une fonction cétone en C8. Les plus importants sont le déoxynivalénol (DON) et ses formes acétylées, le nivalénol (NIV), et la fusarénone-X (FX) ;
- **Groupe C** : constitué par les trichothécènes ayant un époxyde supplémentaire en C7 comme la crotocine ;
- **Groupe D** : constitué par les trichothécènes ayant un macrocycle entre C4 et C15. Les plus importants sont les verrucarines, les roridines et les satratoxines.

La structure des principales trichothécènes des groupes A et B est représentée dans la Figure 20.



Dénomination	R1	R2	R3	R4	R5	Formule brute	Masse moléculaire g/mol
Toxine T2	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	466,50
Toxine HT2	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	424,5
Diacétoxyscirpénol DAS	OH	OAc	OAc	H	H	C ₁₉ H ₂₆ O ₇	366,41
Nivalénol NIV	OH	OH	OH	OH	=O	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	312,32
Déoxynivalénol DON	OH	H	OH	OH	=O	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	296,36

Figure 20. Structure chimique générale des principaux trichothécènes de groupes A et B.

Fusarium sporotrichioides, *F. poae* (*tricinctum*) et *F. equiseti* sont les principales espèces qui produisent les trichothécènes du groupe A ; les principaux représentants de ce groupe sont la toxine T-2 (T-2) et la toxine HT-2 (HT-2) ; la toxine T-2 est considérée la molécule la plus toxique (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

Les trichothécènes du groupe B sont produites, principalement, par *Fusarium graminearum*, *F. nivale* et *F. culmorum*. Les principales mycotoxine du groupe B sont le nivalénol (NIV) et le déoxynivalénol (DON). Le déoxynivalénol (encore appelé) vomitoxine est reconnu comme la mycotoxine la plus répandue (DiMello *et al.*, 1997).

Les trichothécène de groupes A et B peuvent être produites aussi par d'autres espèces de *Fusarium*: *F. acuminatum* et *F. sambuccinum* produisent des trichothécènes du groupe A et *F. croockwellense* des trichothécènes du groupe B.

Le groupe C réuni des trichothécènes produites par les espèces de genres *Trichoderma* et *Trichothecium*.

Les trichothécènes du groupe D sont produites par les espèces de genres *Myrothecium* et *Stachybotrys*; les trichothécènes de ce groupe, les plus connues, sont la roridine, la verrucarine et les satratoxines (DiMello *et al.*, 1997; Placinta *et al.*, 1999)

3.3.4.1- Contamination des aliments

Les trichothécènes sont largement répandues dans les régions tempérées et humides.

La toxine T-2 (T-2) est produite sur les céréales dans de nombreuses parties du monde et sa présence est habituellement associée à une période prolongée d'humidité pendant la moisson.

La toxine T-2 et la toxine HT-2 se retrouvent souvent dans l'avoine.

Le déoxynivalénol (DON) contamine diverses céréales, en particulier le maïs et le blé, mais il a également été détecté, en teneur plus faible, dans d'autres céréales comme l'orge, l'avoine, le seigle et le riz. (Tableau 24)

Les trichothécènes sont essentiellement présentes dans les aliments à base de maïs destinés aux hommes ou aux animaux. Le DON est la mycotoxine la plus répandue dans les céréales et elle est souvent retrouvée dans les farines, les pâtes et les céréales pour le petit déjeuner (Tableau 25)

Tableau 24. Présence de trichothécènes dans les céréales.

Pays	Céréale	Trichothécènes	Niveau de contamination (µg/kg)	Références
Allemagne	seigle	DON NIV	0,5-64,6 17,6-30,4	Gang, 1998
	blé	DON 3aDON NIV DAS	167-735 948 2-73 17	Muller, 2001
	avoine	DON T2 HT2	18-25 6-11 5-23	Schollenberger, 2005
Bulgarie	blé	DON	180	Vrabcheva, 1996
		T2	55	
Chine	blé	DON NIV 15aDON	2850 578 59-1800	Li, 2002
Corée	maïs	DON	0-1500	Abbas, 2002
Etats Unis	blé orge avoine	DON	100-600	MacDonald, 2004
Ethiopie	orge sorgho ble	DON	40-2340	Ayalew, 2006
France	maïs	DON	100-213	Garon, 2006
Inde	maïs	T2	12-30	Jabnardhana, 1999
		DON	17-21	
Indonésie	maïs	DON	21	Ali, 1998
		NIV	49	
Mexique	maïs	T2	7	Robledo, 2001
Nigérie	maïs	DON	226,2	Adejumo, 2007
		3aDON	17,3	
		DAS	16	
Norvège	avoine	HT2	115	Langseth, 1999
		T2	60	
		DON	104	
		NIV	56	
	orge	HT2	73	
		T2	85	
		DON	155	
	blé	NIV	30	
		HT2	20	
T2		20		
Pologne	blé	DON	0-950	Kryszinska-Traczyc, 2001
		NIV	0-1280	
	orge	DON	0,1-156,6	Perkowski, 1998
Roumanie	blé	DON	880	Curtui, 1998
		3aDON	66	
		15aDON	150	
		T2	13	
	maïs	DON	890	
3aDON		180		
15aDON		620		
T2		63		
		DAS	2,6	
Russie	blé orge seigle	DON	0-860	Tutelyan, 2004
			0-910	
			0-1110	
Uruguay	orge	DON	1900-10000	Pan, 2007

Tableau 25. Présence de trichothécènes dans des produits à base de céréales.

Pays	Echantillon	Trichothécènes	Niveau de contamination (µg/kg)	Références
Danemark	farine de blé farine de seigle	DON	191 99	Rasmunssen, 2003
Etats Unis	farine d'avoine blé orge	DON	1 180 65	Ngundi, 2006
Italie	pain pâtes biscuits céréales petit déjeuner	DON	7-930	Cirillo, 2003
Portugal	céréales petit déjeuner	DON	103-6400	Martins, 2001
Aliments composés pour les animaux				
Slovaquie	AC volailles	DON 3aDON 15aDON DAS T2 HT2	0-1230 0-1497 0-229 0-5 0-130 0-173	Labuda, 2005

Les *Fusarium* sont des espèces endophytes; elles se développent seulement sur des plantes vivantes ou elles peuvent produire des mycotoxines. Le trichothécènes, tout comme les fumonisines, ne sont transférées que de manière très limitée à la viande, au lait et aux œufs, et la contribution de la nourriture d'origine animale à l'exposition totale de l'homme à ces toxines est donc insignifiante (Tobias *et al.*, 1992).

3.3.4.2- Effets toxiques des trichothécènes

i) Trichothécènes du groupe A

La plupart des études toxicologiques ont été réalisées avec la toxine T-2. On estime que la toxicité de la HT-2 est équivalente à celle de la T-2.

Les effets observés lors d'étude de la toxicité aiguë chez l'animal sont principalement des symptômes non spécifiques comme la perte de poids, la perte d'appétit, des dermatites, des vomissements, des diarrhées, des hémorragies et des nécroses de l'épithélium gastrique et intestinal et de la moelle osseuse, de la rate, des testicules et des ovaires (Coppock *et al.*, 1985). L'organe cible de la toxine T-2, après exposition à une ou plusieurs doses, est le tissu hématopoïétique, au sein de la moelle osseuse (Diaz et Boermans, 1994, Harvey *et al.*, 1994).

Les études de toxicité subchronique chez le rat, la souris, le porc et le singe rapportent des modifications hématologiques et immunologiques (Vidal, 1990).

Les effets hématotoxiques se manifestent par des leucopénies qui apparaissent après exposition à ces trichothécènes chez de nombreuses espèces. L'apparition d'hémorragies est un des symptômes caractéristiques des intoxications par les trichothécènes chez le rat, la souris, le porc, les bovins, les ovins et l'homme. Ces hémorragies sont dues à une diminution du nombre de plaquettes dans le sang circulant et à des dysfonctionnements de celles-ci (Coppock *et al.*, 1989 ; Gentry *et al.*, 1984).

La myélotoxicité concerne les troubles induits sur la formation des cellules sanguines lors de l'hématopoïèse qui se déroule dans la moelle osseuse. Les atteintes de la moelle osseuse par ces trichothécènes ont été rapportées chez plusieurs espèces (mouton, souris, poulet et cobaye). Elles sont caractérisées par des hypoplasies résultant de la nécrose des cellules médullaires. Dans tous les cas, la toxine T-2 est le plus myélotoxique des trichothécènes (Wang *et al.*, 1998).

Concernant les effets immunotoxiques, l'exposition aux trichothécènes du groupe A induit une diminution du nombre de splénocytes, de thymocytes, de lymphocytes circulants et une déplétion des lymphocytes B dans le foie foetal de souris. Les effets immunotoxiques de la toxine T-2 sont attribués à la déplétion du nombre de lymphocytes T due au dysfonctionnement des macrophages liés aux lymphocytes T (Pestka et Bondy, 1994 ; Oswald et Comera, 1998 ; Islam *et al.*, 1998)

Dans les études de toxicité chronique et de cancérogenèse, des lésions de l'oesophage ont été rapportées chez la souris et le rat ; une augmentation de l'incidence d'adénomes pulmonaires et hépatocellulaires et une hyperplasie de l'épithélium gastrique dose-dépendante ont également été décrites aux plus fortes doses testées (Coulombe, 1993).

Les études visant à rechercher des effets génotoxiques de ces trichothécènes présentent des résultats contradictoires et ne permettent pas de conclure quant à leur génotoxicité.

ii) Trichothécènes du groupe B

Les effets toxiques observés dans les études de toxicité aiguë et subaiguë sont des vomissements, des refus de s'alimenter, des pertes de poids et des diarrhées. Après intoxication aiguë, une nécrose tissulaire est observée au niveau du tractus intestinal, de la moelle osseuse et des tissus lymphoïdes (Marpegan *et al.*, 1988).

Lors des études de toxicité subchronique par voie orale, les effets indésirables observés sont une réduction de la consommation alimentaire, une diminution du gain de poids et des

perturbations de certains paramètres sanguins dont le taux d'immunoglobulines sériques (Zhou *et al.*, 1998 ; Yamamura *et al.*, 1989 ; Li *et al.*, 1997 ; Li *et al.*, 2000). Les effets immunotoxiques de l'exposition aux trichothécènes du groupe B se traduit par une réduction du nombre des cellules des différentes lignées cellulaires immunitaires ainsi qu'une baisse de la résistance à l'infection (Hinoshita *et al.*, 1997 ; Oswald et Comera , 1998 ; Pestka et Bondy, 1994; Ouyang *et al.*, 1996).

Une diminution du nombre de cellules sanguines circulantes due à une myélotoxicité est également décrite avec les trichothécènes du groupe B. Cependant, ces troubles hématologiques semblent avoir une amplitude plus faible que ceux induits par les trichothécènes du groupe A (Bennett et Klich, 2003).

3.3.5- La zéaralénone

La zéaralénone (ZEA) ou toxine F-2 est produite par les espèces appartenant au genre *Fusarium*, en particulier *F. graminearum*, *F. semitectum*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* et *F. culmorum*. Elle peut être également être synthétisée par *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichoïdes* et *F. laterium*. La production de cette mycotoxine est favorisée lorsque les températures sont situées entre 10 et 15°C.

La zéaralénone a été identifiée comme une lactone de l'acide résorcylique ou RAL (Figure21)

Formule brute : C₁₈H₂₂O₅
Poids moléculaire: 318 Da

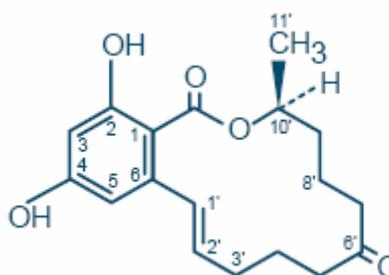


Figure 21. Structure moléculaire de la zéaralénone.

Le noyau de la molécule, constitué par la lactone de l'acide résorcylique (zéaralone), caractérise toute une famille de produits naturels ou dérivés par synthèse chimique.

Les dérivés α et β zéaralénols, métabolites naturels, sont des produits du métabolisme animal ou humain. Ils peuvent être également détectés dans les céréales contaminées (Schollenberger *et al.*, 2005 ; Schollenberger *et al.*, 2006).

3.3.5.1- Contamination des aliments

La contamination des céréales par la ZEA est un phénomène mondial car les espèces de *Fusarium* productrices de cette mycotoxine se développent très facilement dans tous les types climatiques.

La zéaralénone est une toxine fréquente dans le maïs et les produits de maïs, mais sa présence a été aussi détectée dans le soja et diverses céréales et graines, ainsi que dans leurs sous-produits. La présence de zéaralénone est régulièrement observée en association avec d'autres fusariotoxines, en particulier le déoxynivalénol, le nivalénol et les fumonisines.

La ZEA a été détectée comme contaminant naturel du maïs, de l'orge, du blé et du sorgho (Siame *et al.*, 1998; Vargas *et al.*, 2001; Fazekas et Tar, 2001; Odhav et Naicker, 2002), mais aussi de l'avoine et du foin (Coulombe, 1993), du riz et de la noix et du tabac (Maghraby et Abdel-Sater, 1993).

Ainsi, elle a été mise en évidence dans des aliments à base de céréales destinées à l'homme à des concentrations pouvant atteindre 289 µg/g (Kim *et al.*, 1993 ; Yuwai *et al.*, 1994).

Ces données sont présentées dans le Tableau 26.

Tableau 26. Présence de zéaralénone dans les céréales.

Pays	Céréale	Niveau de contamination (µg/kg)	Références
Afrique de Sud	malt sorgho	3-2340	Odhav, 2002
Allemagne	blé	13-37	Muller, 2001
Bostwana	maïs	40	Siame, 1998
Brésil	maïs	36,8-719	Vargas, 2001
Bulgarie	blé	17	Vrabcheva, 1996
Chine	blé	10-217	Li, 2002
Corée	maïs	20,6	Sohn, 1999
Ethiopie	sorgho	32	Ayalew, 2006
France	maïs	23-41	Garon, 2006
Grand Bretagne	maïs	500	Scudamore, 1998b
Hongrie	maïs orge blé	30	Fazekas, 2001
Inde	maïs	30-41	Janardhana, 1999
Indonésie	maïs	11	Ali, 1998
Iran	maïs	100-212	Hadiani, 2002
Italie	maïs	0,1-10	Visconti, 1998
Lituanie	blé	1,77-5,01	Baliukoniene, 2003
	orge	0,34-0,58	
Mexique	maïs	1610	Robledo, 2001
Roumanie	blé	10	Curtui, 1998
	maïs	250	

Peu d'études ont été réalisées en vue de déterminer la teneur en résidus de ZEA dans les tissus animaux. La ZEA peut se retrouver dans les organes de volailles. Cependant les données ne concernent que des expériences faites avec des contaminations artificielles par de fortes doses de ZEA. Ainsi des dindons ayant absorbés 800 ppm sur une période de 2 semaines ont 258 ppb dans les poumons, 295 ppb dans le cœur, 599 ppb dans le rein et 2 991 ppb dans le foie (Olsen *et al.*, 1986).

3.3.5.2- Effets toxiques de zéaralénone

Depuis son isolement en 1962, on a observé des effets toxiques de la zéaralénone dans plusieurs espèces dont les porcs (Swamy *et al.*, 2002a; Greene *et al.*, 1990), les vaches (Diekman et Green, 1992), les agneaux (Hufstedler *et al.*, 1996), les poulets (Swamy *et al.*, 2002b ; Chi *et al.* 1980), les dindes (Allen *et al.*, 1983), le cheval (Minervini *et al.*, 2006), les rongeurs (Yang *et al.*, 2006 ; Perez-Martinez *et al.*, 1997). Cette mycotoxine induit un hyper-oestrogénisme chez les animaux (Rainey *et al.*, 1991), les suines étant l'espèce la plus sensible (Dickman et Green, 1992). Les signes cliniques observés sont des œdèmes du vagin, des atrophies des ovaires (Kaliyamurthy *et al.*, 1997), des hypertrophies des glandes mammaires, des pseudo-gestations, une baisse du niveau de testostérone et de la quantité de sperme, l'apparition de stérilité (Etienne et Dourmad, 1994). Les volailles semblent très résistantes à de fortes contaminations en ZEA puisque des taux de 800 ppm n'entraînent aucun effet (Allen, 1980 ; Allen *et al.*, 1981). Le métabolisme de cette molécule est un facteur clé de la différence de sensibilité inter-spécifique (Zinedine *et al.*, 2007c).

La ZEA n'est pas considérée comme tératogène ; les doses modérées provoquent quelques malformations mineures du squelette, du essentiellement à un retard d'ossification. À des doses supérieures aux contaminations naturelles, chez le porc, on peut mettre en évidence un effet tératogène caractérisé par une altération du développement des membres (Diekman et Green, 1992).

Objectifs de la thèse

Par conséquent, les mycotoxines sont des métabolites secondaires pouvant être produits par de nombreuses espèces fongiques. Leur diversité structurale se traduit par une grande variété de mécanisme d'action et d'effets toxiques. Ces molécules sont des contaminants naturels des aliments et principalement des denrées végétales comme les céréales. La production de ces molécules est directement liée au développement fongique et, par conséquent, peut grandement varier en fonction des paramètres environnementaux qui influent sur la croissance fongique.

La diversité des situations climatiques, écologiques, des procédés cultureux, de conservation et de transformation des aliments fait qu'il n'existe pas de relation directe et systématique entre un substrat – une (des) espèce(s) fongique(s) – une (des) mycotoxine(s). L'objectif de notre travail a donc été de caractériser la flore fongique et la contamination mycotoxique de divers substrats, provenant de divers pays.

2^{ème} partie

Données expérimentales

ANALYSE DE LA FLORE FONGIQUE DE DIFFERENTS SUBSTRATS

Article 1

**Contamination fongique et mycotoxique de céréales produites
dans le Sud est de la Roumanie**

Introduction

Les céréales sont des substrats naturellement favorables au développement fongique. Cette croissance des micromycètes peut avoir plusieurs conséquences néfastes : une altération de l'aspect et des propriétés technologiques des matières premières, le développement de mycoses ou d'allergies (Bennett *et al.*, 2003) et la production et l'accumulation de mycotoxines. On estime ainsi que, chaque année, 5 à 10% des récoltes mondiales sont perdues à cause d'un développement incontrôlé de moisissures.

En Europe, compte tenu du climat tempéré, les *Fusarium* sont en général les contaminants majeurs des céréales (Domijan *et al.*, 2005 ; Klich, 2002 ; Krysinska-Traczyk *et al.*, 2007). Leur développement peut conduire à la contamination des grains par des toxines telles que les trichothécènes, et plus particulièrement le déoxynivalenol (Mankeviciene *et al.*, 2007 ; Pietri *et al.*, 2004 ; Schothorst *et al.*, 2004 ; Schollenberger *et al.*, 2006), la zearalenone (Cervero *et al.*, 2007 ; Mankeviciene *et al.*, 2007 ; Schollenberger *et al.*, 2006) et les fumonisines (Arino *et al.*, 2007 ; Domijan *et al.*, 2005 ; Engelhardt *et al.*, 2006 ; Fandohan *et al.*, 2005 ; Pietri *et al.*, 2004). Compte tenu des particularités écophysiologicals des *Fusarium*, le développement fongique et la mycotoxinogénèse associée ont en général lieu au champ, sur la plante vivante, où en période péri-récolte (Miller, 2002). Le séchage des grains avant stockage permet d'arrêter le développement de ces espèces fongiques hygrophiles.

Pendant le stockage, le développement de *Penicillium*, comme par exemple *P. verrucosum*, peut entraîner une contamination secondaire des grains par d'autres mycotoxines comme l'ochratoxine A (Magan *et al.*, 2005).

Plus rarement en Europe, le développement d'espèces fongiques appartenant au genre *Aspergillus* comme l'*A. flavus* ou l'*A. parasiticus*, peut conduire à la contamination des céréales par l'aflatoxine B1. En général, un tel développement est rapporté après des étés exceptionnellement chauds, comme en 2003 en Italie (Giorni *et al.*, 2007 ; Martins *et al.*, 2007 ; Pietri *et al.*, 2004).

La présence de ces contaminants est importante en termes de santé publique puisque certaines de ces molécules sont cancérigènes chez l'homme et l'animal (AFB1) (IARC, 1993) et que d'autres sont cancérigènes chez l'animal et suspectes d'être carcinogènes chez l'homme (FB1, OTA).

En Europe, des travaux ont été menés afin d'évaluer l'exposition humaine à ces contaminants naturels (projets SCOOP). L'objectif de ces enquêtes était d'évaluer la contamination des matières premières et des aliments en Europe ainsi que d'estimer l'exposition alimentaire des

habitants de l'Union Européenne. Cependant, les derniers pays entrant dans la communauté européenne, dont la Roumanie, n'ont pas été inclus dans ces études. De plus, compte tenu du climat continental qui règne dans ce pays, avec des hivers très froids et des étés chauds et secs, la contamination fongique et mycotoxique des céréales produites dans ce pays pourraient être différentes de celles observées dans les autres pays européens.

Part conséquent, l'objectif de cette première étude a été de caractériser la flore fongique et la contamination mycotoxique de céréales produites en Roumanie, dans la région de Bucarest (Région Sud-Est du pays). Afin de mettre en évidence d'éventuelles variations annuelles de la flore fongique et du niveau de contamination mycotoxique, cette étude a été réalisée sur trois ans, à partir d'échantillons récoltés en 2002, 2003 et 2004.

**Aflatoxin B1, deoxynivalenol and zearalenone contamination of cereals in
South-East Romania.**

Tabuc C.^{1*}, Marin D.¹, Guerre P.², Sesan T³, Bailly JD.²

1: IBNA, Calea Bucuresti, n°1, 077015 Balotesti, Romania

2: Mycotoxicology unit, National Veterinary School of Toulouse, 23 chemin des capelles, 31076 Toulouse
cedex, France.

3 : Faculty of Biology, University of Bucharest, 36-46 M. Kogalniceanu Bd, 70709, Bucharest, Romania

*: corresponding author: crisinatabuc@yahoo.fr, phone: + 33 561 193 901, fax: +33 561 491 263

Summary

Fungal mycoflora and mycotoxin contamination were determined in 110 cereals samples (54 maize, 35 wheat, 21 barley), coming from the south–eastern part of Romania during the 2002 to 2004 period.

The most frequent fungal contaminants belong to *Aspergillus* and *Fusarium* genus, maize being the most contaminated cereal. The main toxinogenic species identified were *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *F. graminearum*, *F. culmorum* in all cereals and *F. verticillioides* in maize. Although cereal mycoflora remains constant over the period of analysis, the prevalence of each species varies from a year to another. Aflatoxin B1 (AFB1), deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEA), fumonisins and ochratoxin A (OTA) contents were analyzed by ELISA. More than 90 % of samples were found contaminated by at least one toxin. Around 30% of maize samples were contaminated with AFB1 and 20% exceeded EU regulation. Depending on the year and the cereal, 57 to 100% of cereals samples were contaminated by DON and ZEA. and 48 and 42% of samples exceeded E.U. regulation from DON and ZEA respectively. Neither fumonisins nor OTA were found, whatever the year and the cereal.

These results demonstrate that strong differences could be noted in the prevalence of fungal species and the mycotoxin content depending on the cereal and the year, confirming the need of regular surveys of cereals in this country.

Key words:

Fungal mycoflora, *Aspergillus*, *Fusarium*, Aflatoxin B1, Deoxynivalenol, Zearalenone, Fumonisin, Ochratoxin A, cereals, Romania

Running title:

Fungal flora and mycotoxins of Romanian cereals.

INTRODUCTION

Fungal development in alimentary substrates can lead to different detrimental effects: alterations of aspect and technological properties, modifications of nutritive value, development of mycosis and allergy agents, and production of mycotoxins (3). The presence of mycotoxins in foods and feeds is regulated in many countries (14). In Europe, due to the temperate climate, *Fusarium* fungi are usually found as major contaminants of cereals (8, 22, 23). Their development may lead to contamination of raw material with toxins such trichothecenes, mainly deoxynivalenol (27, 35, 39, 40) and zearalenone (5, 27, 40) and fumonisines (1, 9, 10, 13, 35). The development of *Penicillium* species, such as *P. verrucosum* may lead to Ochratoxin A contamination (8, 23, 25). More rarely in Europe, the development of *Aspergillus* species such as *A. flavus* and *A. parasiticus*, can lead to the presence of aflatoxin B1, especially after warm summers (16, 29, 35).

Mycotoxins are usually considered as relevant for public health, some of them being considered as carcinogenic. Within this context, efforts to assess human exposure in Europe have been undertaken within SCOOP projects (Scientific Cooperation on Questions relating to Foods). They aimed to evaluate food and feeds contamination and intake of mycotoxins by EU inhabitants (39). However, Romania was not included in these surveys and only few data are available concerning mycotoxin contamination of cereals produced in this new EU member state (6). Moreover due to its continental climate with very cold winter and hot and dry summers, fungal mycoflora and mycotoxin contamination of cereals produced in may differ from that reported in other European countries.

The aim of this study was to analyse fungal mycoflora and mycotoxin contamination of cereals produced in the South East part of Romania during the 2002 to 2004 years.

MATERIAL and METHODS

Solvents and reagents.

All solvents and reagents were purchased from VWR international (Fontenay sous bois, France) and were of analytical grade.

Samples:

110 cereal samples (54 corn samples, 35 wheat samples and 21 barley samples), coming from South Eastern part of Romania were send by producers to IBNA between 2002 and 2004 for fungal and mycotoxin analysis before commercialisation. All samples were thus analysed after an 8-10 months storage period in silos. Mycological and mycotoxin analysis were performed as soon as the sample was received by IBNA.

Fungal count, identification and toxigenic potential determination

Twenty grams of sample were dispersed in 180 ml of 0.05% Tween 80 solution using a warring blender mixer. 1 ml of each decimal dilution was plated on both malt agar medium (2% agar, 2% malt, 50 ppm chloramphenicol) and NaCl added malt agar medium (malt agar + 6% NaCl). Typical fungal colonies were counted after 3, 5 and 7 days of culture at 25 and 31°C. *Aspergillus* and *Fusarium* were then identified to species level according to Pitt (36) Raper and Fennell (38) and Botton (4). *Aspergillus*, *Fusarium* and certain *Penicillium* strains were isolated from plates by several planting out on both malt agar medium and more specific medium: Potato Dextrose agar for *Fusarium* strains, Czapek medium for *Penicillium* and *Aspergillus*.

Mycotoxin quantification:

300 g of samples were finely grinded into powder. A 20g sub-sample was then extracted by mechanical agitation for 3 min in a warring blender using 100 ml of 70% methanol for aflatoxin B1, zearalenone and fumonisins, 50% methanol for ochratoxin A, and de-ionized water for deoxynivalenol. Extract was filtered on Whatman n°1 filter.

The concentration of the monitored mycotoxins (ochratoxin A, aflatoxin B1, deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins) was determined using immunoenzymatic ELISA kits (veratox, Neogen, Scotland) as recommended by the manufacturer. The optical density was read within

20 min on a TEKAN densitometer at 650 nm. Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were respectively 1 and 2 µg/kg for ochratoxin A, 2 and 5 µg/kg for aflatoxin B1, 25 and 25 µg/kg for deoxynivalenol, 5 and 25 µg/kg for zearalenone, 0.2 and 1 mg/kg for fumonisins

Expression of results

For mycotoxin contamination evaluation and mean determination, samples found contaminated with levels < LOD were considered to be contaminated with half the LOD. Samples with levels comprised between LOD and LOQ were considered contaminated with half the LOQ.

RESULTS

Fungal population of cereal samples

The fungal contamination of maize, wheat and barley samples depending on the year of harvest was presented in Figure 1. The overall analysis of these results reveals that maize was the most contaminated cereal with a mean fungal count of 51×10^3 CFU/g followed by wheat and barley that presented respective mean fungal counts of 37.9 and 26.6×10^3 CFU/g. However, fungal counts greatly varied from one year to another. The total fungal contamination registered in 2002 was significantly higher than that reported in the following two years, whatever the cereal considered. For example, a 10-fold difference was observed in fungal contamination of barley between 2002 and 2003 (51.3×10^3 and 5.5×10^3 CFU/g respectively) (figure 1).

Analysis of fungal mycoflora at the genus level was carried out on agar medium after 3, 5 and 7 days of culture at 25 and 31°C (Figure 2). Only weak differences depending on the nature of the cereals were observed. *Aspergillus* was the predominant contaminant fungal genus, always found in more than 50% of samples, followed by *Fusarium* and *Penicillium*. *Aspergillii* were found in 67, 68 and 52%, *Fusarium* in 30, 23 and 52%, and *Penicillium* species in 39, 26 and 33% of maize, wheat and barley samples respectively.

Because mycotoxins contamination depends on the fungal species developing on the substrate, a precise analysis of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* strains was done by several planting out. Table 1 reports the detailed results as a function of the cereal and of the year. Among *Aspergillus* species, *A. niger* was the most frequently found in all tested cereals, followed by *A. flavus*, *A. versicolor* and *A. parasiticus*. *A. fumigatus* was also frequently found in wheat whereas it was never isolated from barley. Other identified *Aspergillus* species were *A. candidus*, *A. terreus*, and *A. restrictus*. No strain of *A. ochraceus* was isolated from analysed samples. Although mean overall contamination with *Aspergillii* showed only mild decrease over the considered period, important variations could be noted at the species level. For example, on maize, *A. flavus* was isolated from more than 68% of samples harvested in 2002 whereas its prevalence was reduced to 10% in 2004. By contrast, *A. parasiticus* and *A. fumigatus* were never found in 2002 samples but contaminated 31 and 21% of maize samples in 2004 (table 1). Similar differences can be observed on wheat and barley.

The *Fusarium* species found in cereal samples mainly belong to *F. culmorum* and *F. graminearum* species. In maize, *F. verticillioides* was also found as a contaminant of 13% of

samples. However, the prevalence of *Fusarium* species greatly differed from one year to another. For example, on maize, *F. verticillioides* was not identified in 2003 whereas in wheat, *Fusarium* species were observed in 60% of samples in 2002 and no strain was isolated in 2004 (table 1).

Penicillium isolates observed mainly belong to *P. brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. griseofulvum* and *P. purpurogenum* species. As it was observed for *Aspergillus* and *Fusarium*, the prevalence of each species differ from the cereal analyzed and the year of sampling.

Mucor, *Rhizopus* and other fungi (mainly *Chladosporium* and *Epicoccum*) were also identified. Contamination greatly varies, depending on the cereal and the year of sampling. Because these fungi are not known to be toxigenic, no strain analysis was performed.

Taken together these results suggest that although the global fungal mycoflora was the same from a year to another whereas the prevalence of each fungal species greatly varies.

Many fungal species isolated from cereal samples are known to be potentially toxigenic. Therefore, mycotoxin content of samples was analysed.

Mycotoxin contamination of cereal samples

Cereal samples were analysed for aflatoxin B1 (AFB1), deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEA), ochratoxin A (OTA) and fumonisins contamination. Results are reported in figure 3.

AFB1 contamination was mainly observed in maize, with a mean frequency of 29% of contaminated samples. Mean level of contamination was about 7 µg/kg, the highest contamination levels observed being about 45 µg/kg. For wheat and barley, AFB1 contamination appeared very rare, only 4 samples out of 56 analyzed exceed the regulatory EU limit of 5 µg/kg (14), the level of AFB1 being always below 7 µg/kg (figure 3A).

Deoxynivalenol was found in more than 57% of samples, whatever the cereal. Contamination levels observed in the three cereals often exceed several thousand of µg/kg, with highest levels around 20000 µg DON/kg (table 2). Levels of contamination appeared often higher in maize compared to wheat and barley (figure 3B). 48, 56 and 61% of maize, wheat and barley samples respectively exceeded 1750 µg/kg that is E.U. regulation for DON (12)

Zearalenone was the most frequent mycotoxin of analysed cereals since always more than 83% of samples were found contaminated. Surprisingly all barley samples were found contaminated, and the level of ZEA was more important in barley than in maize (figure 3C). Contamination level was usually ranging from several tens to one hundred µg/kg and 33, 40

and 65% of maize, wheat and barley samples exceeded 100 µg/kg that corresponds to E.U. regulation for ZEA (12)

None of the analysed samples presented contamination with OTA or fumonisins exceeding the detection limits of analytical method used (1 and 200µg/kg respectively).

As for fungal contamination, differences in mycotoxin contamination could be noted depending on the year. Indeed, 19, 31 and 37% of maize samples were found contaminated with AFB1 in 2002, 2003 and 2004 respectively. The mean contamination observed also varied, being of 5.3 µg/kg in 2002; 7.1 µg/kg in 2003 and 8.3 µg/kg in 2004 (figure 3A). For DON, samples from 2003 appeared more contaminated than those from 2002 and 2004, whatever the cereal considered (figures 3B). Zearalenone content appeared more constant throughout the study, mean levels of contamination being quite similar during the three analyzed years, especially for wheat and barley (figure 3C).

DISCUSSION

This study reports for the first time the fungal contamination and the mycotoxin contents of cereals harvested in South East part of Romania over three years of sampling. Many surveys done worldwide previously demonstrated that these raw materials could be contaminated with various fungal species, and that both fungal and mycotoxins contaminations vary depending on the climate. Indeed, whereas the *Fusarium* species develop in the field on the living plants, *Aspergillus* and *Penicillium* mainly grow during storage (31, 42). In all cases, mould development and subsequent mycotoxin production is directly related to hydrothermic conditions (20, 28, 37). Because Romania is located in the South East part of Europe, a continental climate characterized by dry and cold winter and hot summer prevails in this country. This climate may influence fungal species able to develop on cultures grown in this country, and both fungal and mycotoxins contamination of cereals may differ from those reported in other European countries. Because climatic conditions vary between years, samplings were performed during three years. Moreover, because fungal growth varies depending on the substrate, together maize, wheat and barley were analyzed.

We showed that *Aspergillus* fungi were very frequent contaminants of maize, wheat and barley. This is in agreement with other study done in countries where climate during spring and summer may be comparable such as Italy or Spain (16, 30). *Aspergillus* identification at

the species level revealed that *Aspergillus niger* was the most frequent contaminant of cereals. This species is a very frequent fungal contaminant found worldwide on various substrates such as cereals, but also grapefruits, or coffee bean (2, 24, 26). It has been shown to produce ochratoxin A (11), but usually at low level (17). By contrast, *Aspergillus ochraceus*, the most important producer of ochratoxin A (34), was never isolated from analysed samples. OTA was monitored in all cereal samples but this mycotoxin was never found, in agreement with the results of fungal identification.

Also, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, known to produce the carcinogenic mycotoxin AFB1 (18, 32), were frequent contaminants of cereals in Romania. Surprisingly, more than 20% of maize samples analyzed were found to exceed E.U. regulation for AFB1 in human food. Although the presence of AFB1 in maize produced in Europe is surprising, this is not the first report of such a contamination. Indeed, recent surveys in Italy demonstrated the presence of AFB1 contamination of foods and feeds, (16, 35). However, whereas the results obtained in Italy follow the exceptional dry and hot summer 2003, AFB1 contamination in Romania seems to occur each year. No AFB1 was found on wheat and barley, confirming that *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* toxinogenesis potential depends on the substrate where they grow (21, 30).

Fusarium species were also frequently isolated from Romanian cereals samples, as reported in other European countries. *F. graminearum* and *F. culmorum* were present on the three kinds of cereals and more than 65% of samples were found contaminated with DON or ZEA. These results are in agreement with those reported in other regions of Romania (6). They are also in agreement with results observed in countries located in north part of Europe such as the North of France, Germany, Norway, Belgium, Poland or Netherlands (19, 23, 39, 40). Among the three cereals tested maize appeared the most contaminated with DON, in agreement with results from SCOOP task (39). Levels of contamination by deoxynivalenol often exceeded EU regulation for cereals intended for human food (64% of samples contaminated with more than 1750 µg/kg) (12). These levels of contamination in Romania are much higher than those reported in other European countries where the percentage of samples exceeding 750 µg/kg are usually less than 10% (39). Zearalenone is also an important contaminant since 44% of analysed samples exceeded the content of 100 µg/kg that is EU regulation value for this toxin (12). Once again these contamination levels appear higher than those usually reported in other European countries (15, 27). Barley was found to be the most contaminated cereal in agreement with data from the north of Europe (27).

F. verticilloides was identified in maize samples. The frequency of contamination of maize grains with this fungal species is in agreement with occurrence observed in near countries, such as Croatia (8) but appeared less important than that usually reported in other countries. Indeed, *Fusarium verticillioides* prevalence was less than 30% in maize samples, whereas results coming from Spain, Argentina or Benin report a *Fusarium verticillioides* prevalence higher than 60% (1, 13, 33). Fumonisin were never found in analysed maize samples. This finding is in agreement with previous studies reporting only very low level of fumonisin contamination of maize cultivated in Eastern Europe (6, 41). It differs from results obtained in the south of France and Italia where high frequencies of positive samples were reported (7, 35, 41).

Taken together, these results demonstrate that cereals produced in Romania present a particular pattern of fungal mycoflora and mycotoxin contamination. Indeed, DON and ZEA appear important contaminant as reported for cereals produced in North and Central part of Europe. Also, AFB1 in maize often overtakes E.U regulation in human food, as observed after exceptional dry and hot summer in some countries of south Europe. This last point specially highlights that the carcinogenic mycotoxin AFB1 has still to be monitored in Europe, since local or temporary climatic conditions can lead to contamination of food and feeds.

REFERENCES

- 1- Arino, A., T. Juan, G. Estopanan, and J.F. Gonzalez-Cabo. 2007. Natural occurrence of *Fusarium* species, fumonisin production by toxigenic strains and concentration of fumonisins B1, and B2 in conventional and organic maize grown in Spain. *J. Food Prot.* 70: 151-156.
- 2- Battilani, P., C. Barbano, S. Marin, V. Sanchis, Z. Kozakiewicz, and N. Magan. 2006. Mapping of *Aspergillus* section *Nigri* in southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 111 : S72-S82
- 3- Bennett, J.W., and M. Klich. 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16 : 497-516.
- 4- Botton, B. *et al.* 1990. Moisissures utiles et nuisibles: importance industrielle, 2^{ème} ed. Masson ed, Paris.
- 5- Cervero, M.C., M.A. Castillo, R. Montes, and E. Hernandez. 2007. Determination of trichothecenes, zearalenone and zearalenols in commercially available corn-based foods in Spain. *Rev. Iberoam. Micol.* 24: 52-55.

- 6- Curtui, V, E. Usleber, R. Dietrich, J. Lepschy, and E. Martlbauer. 1998. A survey on the occurrence of mycotoxins in wheat and maize from western Romania. *Mycopathologia* 143 : 97-103.
- 7- Direction Générale de l'Alimentation. 2005. Bilan des plans de surveillance et de contrôle. Available at http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/upload/bibliotheque/838038044692232700299451445037/bilan2004_plans_surveillance_DGAL.pdf
- 8- Domijan, A.M., M. Peraica, B. Cvjetkovic, S. Turcin, Z. Jurjevic, and D. Ivic. 2005. Mould contamination and co-occurrence of mycotoxins in maize grain in Croatia. *Acta Pharm.* 55: 349-356.
- 9- Domijan, A.M., M. Peraica, Z. Jurjevic, D. Ivic, and B. Cvjetkovic. 2005. Fumonisin B1, fumonisin B2, zearalenone and ochratoxinA contamination of maize in Croatia. *Food Addit. Contam.* 22: 677-680.
- 10- Engelhardt, G., J. Barthel, and D. Sparrer. 2006. Fusarium mycotoxins and ochratoxin A in cereals and cereal product : results from the Bavarian Health and Food Safety Authority in 2004. *Mol. Nutr. Food Res.* 50: 401-405.
- 11- Esteban, A., M.L. Abarca, M.R. Bragulat, and F.J. Cabanes. 2006. Effect of pH on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. *Food Addit. Contam.* 23: 616-622.
- 12- European Union. 2005. Commission regulation 856/2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards Fusarium toxins. *Off. J. E. U.* 143: 3-8.
- 13- Fandohan, P., B. Gnonionfin, K. Hell, W.F. Marasas, M.J. Wingfield. 2005. Natural occurrence of *Fusarium* and subsequent fumonisin contamination in preharvest and stored maize in Benin. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 173-183.
- 14- F.A.O., worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO food and nutrition papers, Rome, Italy, 81, 2004.
- 15- Gareis, M., R. Schothorst, A. Vidnes, C. Bergsten, and B. Paulsen. 2003. Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of E.U. member states. Report of SCOOP task 3.2.10. Available at <http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf>
- 16- Giorni, P., N. Magan, A. Pietri, T. Bertuzzi, and P. Battilani. 2007. Studies on *Aspergillus* section flavi isolated from maize in northern Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 113: 330-338.
- 17- Hajjaji, A., M. El Otmani, D. Bouya, A. Bouseta, F. Mathieu, S. Collin, and A. Lebrihi. 2006. Occurrence of mycotoxins (ochratoxin A, deoxynivalenol) and toxigenic fungi in Moroccan wheat grains: impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production. *Mol. Nutr. Food Res.* 50: 494-499.

- 18- I.A.R.C. 1993. Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *In* Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. World Health Organization, Lyon, France.
- 19- Isebaert, S., G. Haesaert, R. Devreese, P. Maene, F. Fremaut, and G. Vlaemynck. 2005. *Fusarium* spp and *Fusarium* mycotoxins in maize: a problem for Flanders? *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 70: 129-136.
- 20- Jimenez, M., M. Manez, and E. Hernandez. 1996. Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 417-421.
- 21- Juskiewicz, T., and J. Piskorska-Pliszczynska. 1992. Occurrence of mycotoxins in animal feeds. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 11: 211-215.
- 22- Klich, M.A. 2002. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia*, 94: 21-27.
- 23- Krysinska-Traczyk, E., J. Perkowski, and J. Dutkiewicz. 2007. Levels of fungi and mycotoxins in the samples of grain and grain dust collected from five various cereal crops in eastern Poland, *Ann. Agric. Environ. Med.* 14: 159-167.
- 24- Leong, S.L., L.T. Hien, T.V. An, N.T. Trang, A.D. Hocking, and E.S. Scott. 2007. Ochratoxin A producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee bean. *Lett. Appl. Microbiol.* 45: 301-306.
- 25- Magan, N., and D. Aldred. 2005. Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. *Food Addit. Contam.* 22: 1-10.
- 26- Magnoli, C.E., A.L. Astoreca, S.M. Chiacchiera, and A.M. Dalcerro. 2007. Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. *Mycopathologia*, 163 : 249-260.
- 27- Mankeviciene, A., B. Butkute, Z. Dabkevicius, and S. Suproniene. 2007. *Fusarium* mycotoxins in lithuanian cereals from the 2004-2005 harvests. *Ann. Agric. Environ. Med.* 14: 103-107.
- 28- Marin, S., N. Magan, A.J. Ramos, and V. Sanchis. 2004. Fumonisin producing strains of *Fusarium*: a review of their ecophysiology. *J. Food Prot.* 67, 1792-1805.
- 29- Martins, H.M., M.M. Mendes Guerra, and F.M. d'Almeida Bernardo. 2007. Occurrence of Aflatoxin B1 in diary cow feeds over 10 years in Portugal (1995-2004). *Rev. Iberom. Micol.* 24 : 69-71.
- 30- Medina, A., F.M. Valle-Algarra, R. Mateo, J.V. Gimeno-Adelntado, F. Mateo, and M. Jimenez. 2006. Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *Int. J. Food Microbiol.* 108: 196-203.

- 31- Miller, J.D. 2002. Aspects of the ecology of Fusarium toxins in cereals. *Adv. Exp. Med. Biol.* 504: 19-27.
- 32- Moreno Romo, M.A., and G. Suarez Fernandez. 1986. Aflatoxin producing potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from Spanish poultry feeds. *Mycopathologia* 95: 129-132.
- 33- Ono, E.Y., Y. Sugiura, M. Homechin, M. Kamogae, E. Vizzoni, Y. Ueno, and E.Y. Hirooka. 1999. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the state of Panama, Brazil. *Mycopathologia* 147: 139-148.
- 34- Pardo, E., S. Marin, A.J. Ramos, and V. Sanchis. 2006. Ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* isolates. Predictive models for fungal spoilage prevention: a review. *Food Addit. Contam.* 23 : 398-410.
- 35- Pietri, A., T. Bertuzzi, L. Pallaroni, and G. Piva. 2004. Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in northern Italy. *Food Addit. Contam.* 21: 479-487.
- 36- Pitt, J.L. 1988. Laboratory guide to common *Penicillium* species. Academic Press, London,
- 37- Ramirez, M.L., S. Chulze, and N. Magan. 2006. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grains. *Int. J. Food Microbiol.*, 106, 291-296.
- 38- Rapper, K.B., and D.I. Fennel. 1965. *The genus Aspergillus*, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
- 39- Schothorst, R.C., and H.P. Van Egmond. 2004. Report from SCOOP task 3.2.10 “collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the EU member states”. Subtask: trichothecenes. *Toxicol. t.* 153: 133-143.
- 40- Shollenberger, M., H.M. Muller, M. Ruffle, S. Suchy, S. Plank, and W. Drochner. 2006. Natural occurrence of 16 Fusarium toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany. *Mycopathologia* 161: 43-52.
- 41- Visconti, A. 1996. Fumonisins in maize genotypes grown in various geographic areas. *Adv. Exp. Med. Biol.* 392: 193-204.
- 42- Wilson, D.M., W. Mubatanhema, and Z. Jurjevic. 2002. Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. *Adv. Exp. Med. Biol.* 504: 3-17.

Figure 1: Fungal contamination of maize (v), wheat (v) and barley (v) samples as a function of the year of harvest. Results are expressed as mean \pm S.E.

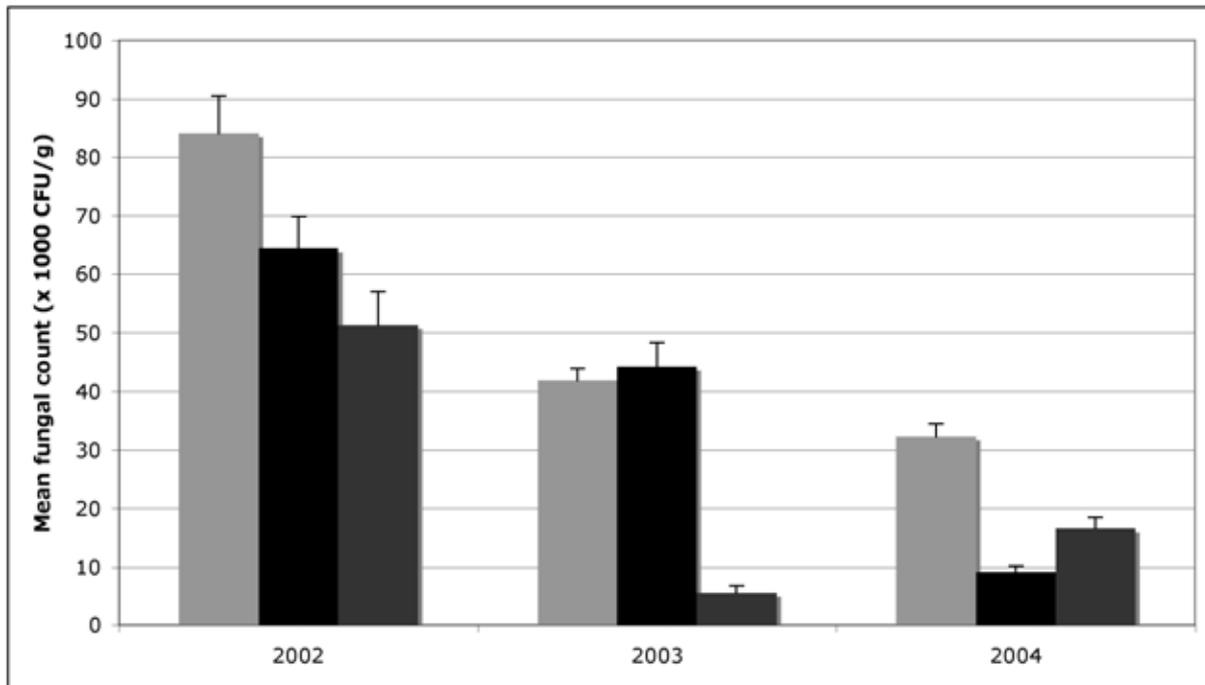


Figure 2: *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* prevalence in Romanian cereals during the 2002-2004 period

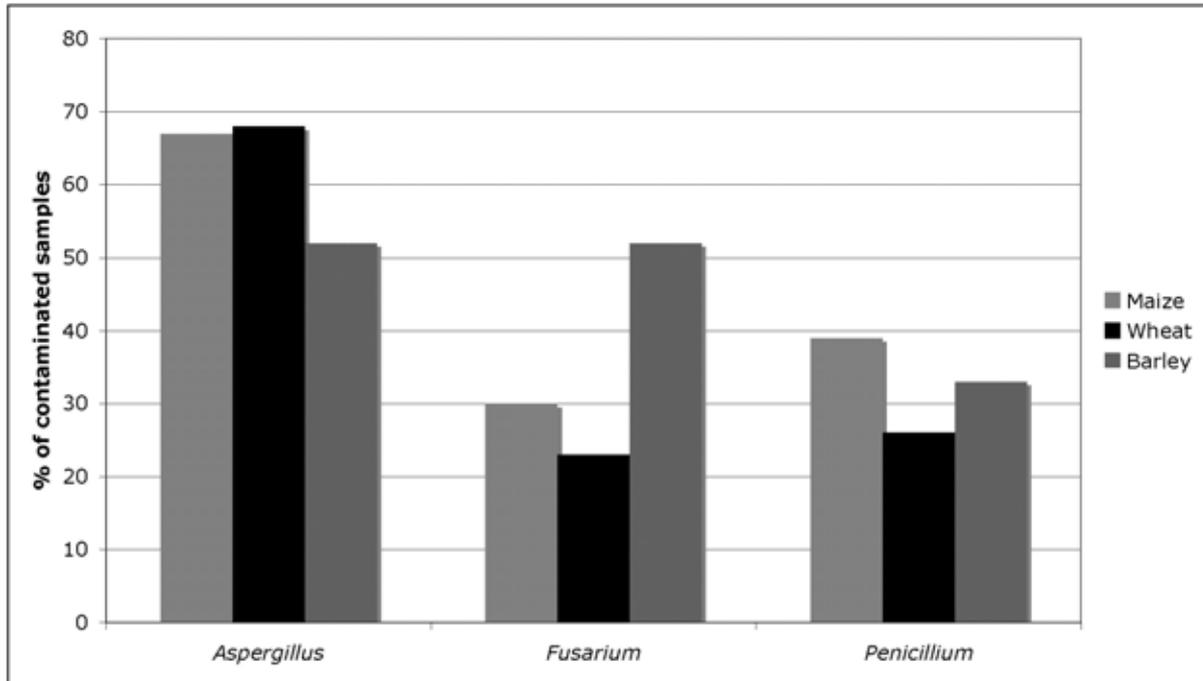


Figure 3: mean mycotoxin contamination of cereal samples in 2002 (v), 2003 (v) and 2004 (v).

A: AFB1; B : DON, C : ZEA ;  : E.U. regulation ;  : limit of detection

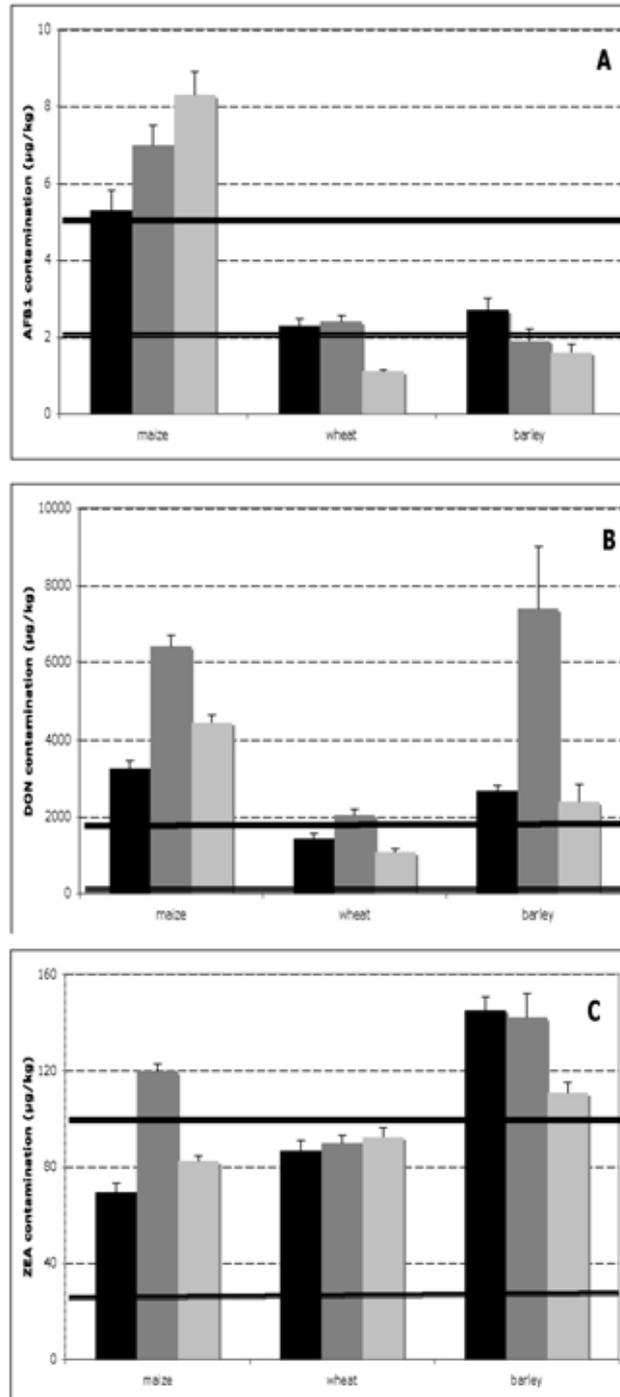


Table 1: fungal species isolated from maize, wheat and barley samples

	Maize			Wheat			Barley		
	2002 (n=16)	2003 (n=19)	2004 (n=19)	2002 (n=10)	2003 (n=13)	2004 (n=12)	2002 (n=8)	2003 (n=6)	2004 (n=7)
<i>Aspergillus</i>	87.5	63	52	100	69	67	75	50	28.5
<i>A. niger</i>	87.5	58	42.1	70	30	50	75	50	28.2
<i>A. flavus</i>	68.75	26.3	10	100	54	25	62.5	0	0
<i>A. versicolor</i>	68.75	42	31.5	20	23	25	0	16.7	14
<i>A. parasiticus</i>	0	42	31	30	23	41	50	0	15
<i>A. fumigatus</i>	0	0	21	70	38	0	0	0	0
Others	37.5	63	42	60	60	50	62.5	0	28.5
<i>Fusarium</i>	30	37	26	60	46	0	87.5	50	28.5
<i>F. graminearum</i>	30	37	21	30	46	0	75	33.3	14.5
<i>F. culmorum</i>	25	21	10.5	40	30.7	0	75	16.7	14
<i>F. verticillioides</i>	0	31	21	0	0	0	0	0	0
Others	30	0	0	30	7.7	0	37.5	0	0
<i>Penicillium sp.</i>	62.5	26.3	31.5	60	30.8	8	50	0	42.8
<i>P. griseovulvum</i>	62.5	21	21	50	30	0	37	0	28.5
<i>P. purpurogenum</i>	56	16	26	60	30	8	37	0	43
<i>P. citrinum</i>	50	16	16	60	25	0	50	0	0
<i>P. brevicompactum</i>	31	15	21	50	30	8	30	0	14
Others	56	16	16	50	20	8	37	0	28
<i>Mucor</i>	55	63	47	20	15.4	67	62.5	33.3	42.8
<i>Rhizopus</i>	75	42	21	60	46.2	17	37.5	0	42.8
Micelleaneous*	19	21	10	10	7.8	0	25	0	14.3

Results are expressed as % of contaminated samples for each species.

*: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Trichoderma*

Table 2 : Aflatoxin B1, deoxynivalenol and zearalenone contamination of maize, wheat and barley *

	Maize				Wheat				Barley			
	2002 (n =16)	2003 (n=19)	2004 (n=19)	2002 (n=10)	2003 (n=13)	2004 (n=12)	2002 (n=8)	2003 (n=6)	2004 (n=7)			
Aflatoxin B1												
Mean (\pm SE)	5.3 (\pm 0.5)	7.1 (\pm 0.5)	8.3 (\pm 0.6)	2.3 (\pm 0.16)	2.4 (\pm 0.15)	1.1 (\pm 0.04)	2.7 (\pm 0.3)	1.9 (\pm 0.3)	1.6 (\pm 0.2)			
Range of contamination (μ g/g)	0 - 46.4	0 - 33.5	0 - 48.1	0 - 6.4	0 - 6.4	0 - 2.5	0 - 7.2	0 - 5	0 - 5			
Numbers of samples > 5 μ g/kg (%)**	3 (19%)	6 (31%)	7 (37%)	1 (10%)	2 (16%)	0 (0%)	1 (12.5%)	0 (0%)	0 (0%)			
Deoxynivalenol												
Mean (\pm SE)	3264.1 (\pm 195)	6397 (\pm 292)	4423 (\pm 198)	1422 (\pm 128)	2049 (\pm 144)	1070 (\pm 90)	2675 (\pm 133)	7385 (\pm 1616)	2391 (\pm 457)			
Range of contamination (μ g/g)	0 - 11000	0 - 22000	0 - 10900	0 - 3600	0 - 5800	0 - 3200	0 - 4000	0 - 22500	0.9 - 4800			
Numbers of samples > 1750 μ g/kg (%)**	10 (62.5%)	14 (73.7%)	12 (63%)	3 (30%)	8 (61%)	3 (25%)	7 (87.5%)	3 (50%)	3 (43%)			
Zearalenone												
Mean (\pm SE)	69.3 (\pm 3.9)	119.8 (\pm 3)	82.3 (\pm 2.1)	86.5 (\pm 4.3)	89.8 (\pm 3.2)	92.3 (\pm 3.9)	145 (\pm 5.5)	142 (\pm 9.7)	110.8 (4.1)			
Range of contamination (μ g/g)	0 - 249	43.7 - 246.2	0 - 147.3	0 - 142	0 - 148	0 - 145	86 - 202	85 - 236	71 - 147			
Numbers of samples > 100 μ g/kg (%)**	3 (18.7%)	11 (57.9%)	4 (21%)	4 (40%)	5 (38.5%)	5 (41.6%)	6 (75%)	5 (83.3%)	4 (57%)			

*: Fumonisin and ochratoxin A contents were always under detection limits of the analytical method used (200 and 1 μ g/kg respectively)

** : E.U regulation (12, 14)

Discussion

Il est clairement établi que la contamination fongique des céréales au champ ou pendant le stockage est directement lié aux conditions hydrothermiques (Miller, 2002 ; Wilson *et al.*, 2002). A ce titre, la localisation géographique de la Roumanie lui confère un climat de type continental, caractérisé par des périodes hivernales froides et sèches et des étés chauds. Notre étude a permis de montrer que, dans ces conditions climatiques, les *Aspergillus* sont des contaminants fréquents du maïs, mais aussi de l'orge et du blé produits dans cette région. La flore fongique de ces matières premières se rapproche de celles observées dans des pays où le climat est proche en été comme l'Italie ou l'Espagne (Giorni *et al.*, 2007 ; Medina *et al.*, 2006).

Parmi les espèces fongiques appartenant au genre *Aspergillus*, il faut souligner la grande prévalence de l'*Aspergillus flavus*. Cette fréquence de contamination importante s'accompagne aussi de la production d'aflatoxine B1 puisque 20% des échantillons ont présenté un niveau de contamination supérieur à la législation européenne en vigueur. Si cette présence d'Aflatoxine est surprenante, ce n'est pas la première fois qu'une telle contamination est observée en Europe. En effet, des enquêtes récentes menées en Italie ont démontré la présence d'aflatoxine B1 dans les certaines matières premières et aliments pour animaux (Pietri *et al.*, 2004). Toutefois, alors que ces résultats ont été obtenus après un été exceptionnellement chaud et sec en 2003, il semble que la contamination du maïs par l'aflatoxine B1 survienne de façon beaucoup plus régulière en Roumanie. Par contre, aucune contamination n'a été observée sur l'orge et le blé, ce qui montre bien l'importance de la nature du substrat sur la mycotoxinogénèse (Juskiewicz *et al.*, 1992 ; Pietri *et al.*, 2004).

L'analyse de la flore fongique des céréales produites en Roumanie a aussi mis en évidence la présence fréquente d'espèces appartenant au genre *Fusarium*, comme il est classiquement rapporté dans d'autres pays européens.

Fusarium graminearum et *Fusarium culmorum* sont retrouvés sur les trois types de céréales étudiés et plus de 65% des échantillons analysés étaient contaminés par le déoxynivalénol et/ou la zéaralénone, ce qui confirme des résultats obtenus précédemment dans ce pays (Curtui *et al.*, 1998). Ces résultats sont aussi en accord avec ceux classiquement obtenus dans les pays du nord de l'Europe comme le nord de la France, l'Allemagne, la Norvège, la Belgique, la Pologne ou les Pays-Bas (Isebaert *et al.*, 2005 ; Krysinska-Traczyk *et al.*, 2007 ; Shothorst *et al.*, 2004 ; Schollenberger *et al.*, 2006).

Le niveau de contamination des céréales par le DON apparaît important puisque 64% des échantillons présentent une teneur en mycotoxine supérieure à la réglementation européenne pour l'alimentation humaine (1750 µg/kg) (E.U., 2005). Un tel niveau de contamination est largement supérieur à ce qui est classiquement rapporté lors des enquêtes européennes (Schothorst *et al.*, 2004).

De même, la zéaralénone est un contaminant fréquent des céréales produites en Roumanie et plus de 40% des échantillons dépasse la teneur réglementaire de 100 µg/kg.

L'analyse de la flore fongique des échantillons de maïs a aussi permis de mettre en évidence la présence de *Fusarium verticilloides*. La fréquence de contamination par cette espèce apparaît similaire à celle rapportée dans des pays voisins (Domijan *et al.*, 2005) mais semble plus faible que celle habituellement rencontrée ailleurs en Europe ou dans le monde (Gareis *et al.*, 2003 ; Mankeviciene *et al.*, 2007). Cette observation est en accord avec les études montrant un très faible niveau de contamination du maïs produit en Europe de l'est par les fumonisines (Curtui *et al.*, 1998 ; Visconti, 1996).

Dans l'ensemble, nos résultats montrent que les céréales produites en Roumanie présentent un profil particulier à la fois en ce qui concerne la flore fongique et la contamination mycotoxique. En effet, le DON et la ZEA apparaissent être des contaminants importants, comme ce qui est classiquement décrit pour les céréales produites en Europe du nord et en Europe centrale. En parallèle, la contamination par l'Aflatoxine B1 est souvent supérieure à la réglementation européenne, comme il a pu être décrit dans des pays au climat chaud, ou en Europe, après des étés exceptionnellement chauds dans le sud de l'Europe.

Ce dernier point souligne l'importance de continuer la surveillance de ce contaminant en Europe, où les conditions climatiques locales peuvent permettre la production et l'accumulation de ce composé carcinogène dans les aliments destinés à l'homme ou l'animal.

Article 2

Contamination fongique et mycotoxique du maïs vietnamien

Introduction

Si le climat tempéré qui prévaut en Europe est particulièrement favorable au développement d'espèces fongiques du genre *Fusarium* sur les céréales, les matières premières cultivées dans les zones tropicales comme l'Amérique du Sud, l'Afrique équatoriale ou l'Asie sont, quant à elle, plus particulièrement exposées à la contamination par des espèces appartenant au genre *Aspergillus*, qui sont thermo-préférentes. Ainsi, la plupart des enquêtes menées dans ces régions ont mis en évidence la prédominance des espèces fongiques du genre *Aspergillus* dans ces substrats (Takahashi *et al.*, 2004 ; Erlich *et al.*, 2007 ; Gao *et al.*, 2007). Malgré l'importance alimentaire des céréales et les risques associés de contamination fongique et mycotoxique (climat, conditions de récolte, de séchage et de stockage,...) peu de données étaient disponibles sur la contamination fongique et mycotoxique des céréales produites au Vietnam (Wang *et al.*, 1995). Or, le maïs représente la seconde production céréalière au Vietnam, après le riz. Il sert d'aliment de base, en substitution au riz, lorsque ce dernier vient à manquer, particulièrement dans les zones rurales et montagneuses du pays. Il s'agit aussi de la principale matière première de l'alimentation animale dans ce pays. La production de maïs a ainsi progressé de plus de 160% au cours des 10 dernières années (Tran Ha *et al.*, 2004). L'objectif de cette seconde étude a donc été de caractériser la flore fongique et mycotoxique d'échantillons de maïs produits au Vietnam.

Ce pays se présente comme une longue bande de près de 2000 km du nord au sud sur seulement 200 km de large. Cette particularité géographique fait qu'il existe des différences notables de climat entre différentes régions du pays. Dans le nord du pays, les températures sont relativement constantes, avec des moyennes de l'ordre de 24°C toute l'année. Dans le sud, le climat est de type sub-équatorial avec deux saisons marquées : une saison sèche pendant laquelle les températures peuvent monter jusqu'à 40°C, et une saison des pluies, de Mai à Novembre. La région centrale du pays présente un climat intermédiaire.

Pour cette raison, nous avons analysé des échantillons prélevés dans différentes régions du pays, afin de mettre en évidence d'éventuelles différences de flore fongique.

Fungal mycoflora and contamination of maize from Vietnam with fumonisin B1 and aflatoxin B1

Trung T.S.¹, Tabuc C.¹, Bailly S.², Querin A.¹, Guerre P.¹, Bailly J.D.^{1*}

1 : Equipe de mycotoxicologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, BP 87614, 23 chemin des capelles, 31076 Toulouse cedex

2 : Laboratoire Myco 2B, BP4, 31170 Tournefeuille

* : corresponding author. E-mail: jd.bailly@envt.fr

Summary

Twenty five samples of maize intended for human or animal consumption coming from north, central and south of Vietnam were analysed for fungal contamination and for the presence of aflatoxin B1 and fumonisin B1. The total fungal load was found to be greater in maize intended for animal feed than that for human with average levels of 4.10^6 and 7.10^5 CFU/g respectively. Identification of fungal strains revealed that *Aspergillus* was the most frequent genus, and was found in all maize samples, whatever their intended use or their geographic origin. Among *Aspergillus* species, *A. flavus* was the most frequent contaminant, observed in more than 90% of samples. Other fungal strains found in Vietnamese maize samples belonged to the *Penicillium*, *Fusarium* Genus and Mucorales and were found in 53, 23 and 23 % of samples respectively. All samples were tested for both aflatoxins and fumonisins contamination. Aflatoxin B1 was found in 17 samples out of 25 (68%). Twelve samples were found contaminated by concentrations of mycotoxin ranging from 11 to 128 $\mu\text{g}/\text{kg}$ including two samples with contamination levels of 98 and 126 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. All samples containing more than 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ were destined for animal feed. Maize for human consumption was found frequently contaminated (10 out of 13 samples) but the level of contamination was lower. Fumonisin B1 contamination was found in eight out of 25 samples (30%). Detected amounts of Fumonisin ranged from 0.5 to 3.2 mg/kg.

Key Words:

Maize, Vietnam, Aflatoxin B1, Fumonisin B1, fungal mycoflora

Running title:

Fungal flora and mycotoxin contamination of Vietnamese maize

Introduction

Fungal development in alimentary substrates has detrimental effects: changes in appearance, changes in technological properties, changes in nutritive value, the development of mycosis and allergy agents, and the production of refuse factors and zootoxic compounds called mycotoxins (Bennett and Klich, 2003).

Maize is a very good substrate for fungal growth and toxinogenesis. Many surveys conducted worldwide showed that this food can be contaminated by mycotoxins such as aflatoxins (Wang *et al.*, 2006; Zinedine *et al.*, 2007), ochratoxin A (Domijan *et al.*, 2005; Sangare-Tigori *et al.*, 2006), trichothecenes (Schothorst and van Egmond, 2004; Pietri *et al.*, 2004), fumonisins (Nikiema *et al.*, 2004; Pietri *et al.*, 2004; Domijan *et al.*, 2005; Fandohan *et al.*, 2005; Arino *et al.*, 2007). All these molecules have been shown to be toxic in rodents and may be responsible for toxic accidents in farm animals when concentrations in feeds are high (Le Bars and Le Bars, 1996; Bennett and Klich, 2003). More frequently, they are responsible for a decrease in breeding performance and subsequent economic losses for farmers (Hussein and Brasel, 2001). The presence of such molecules may also be a public health concern. Aflatoxin B1 (AFB1) has been classified as carcinogenic in humans, leading to the appearance of hepatocarcinoma (IARC, 1993). Other mycotoxins such as ochratoxin A (OTA) and fumonisin B1 (FB1) display carcinogenic properties in laboratory animals and have therefore been classified by IARC in the group 2B of molecules that are carcinogenic in animals and possibly carcinogenic in humans (IARC, 1993; Gelderblom *et al.*, 2001; Pfohl-Leszkowicz and Manderville, 2007).

In addition, these molecules do not all have the same mechanism of action. For example, AFB1 is genotoxic. It induces the formation of DNA adducts or changes in DNA (Macé *et al.*, 1997) and is considered to be a cancer initiator. By contrast, FB1 does not interact with DNA but more probably modifies the cell death and proliferation mechanisms, acting as a cancer promoter (Riley *et al.*, 2001). As a result, the co-contamination of foods by several mycotoxins, with different mechanisms of action raises the problem of a possible synergy between these toxic agents. That is why the presence of mycotoxins in foods and feeds is important and is regulated in many countries (FAO, 2004).

Maize is the second most important food crop in Vietnam, after rice (Than Ha *et al.*, 2004). It is the substitute staple in periods of rice shortage, especially for people in the rural areas and mountainous regions. Maize is also the primary source of feed for Vietnam's livestock industry. Maize production has risen sharply since 1990, and increased by 161% between

1990 and 1999 (Than Ha *et al.*, 2004).

Despite the alimentary importance of maize as a food in Vietnam, and the existence of the mycotoxic risk, mainly linked to climatic conditions and crop handling and storage procedures, only one survey on the fungal and mycotoxic contamination of maize in Vietnam was published more than 10 years ago (Wang *et al.*, 1995). The two aims of this study were to determine fungal contamination of maize samples from Vietnam, and to evaluate contamination of this very important foodstuff by mycotoxins.

Material and methods

Solvents and reagents

All solvents and reagents were purchased from VWR international (Fontenay sous bois, France) and were of analytical grade. Mycotoxins standards (aflatoxin B1, fumonisin B1) were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). Aflatoxin B1 was dissolved in toluene-acetonitrile (98:2), fumonisin B1 in acetonitrile-water (70:30) to obtain 1 mg/ml stock solutions which was stored at -20°C .

Sampling

All samples were taken in markets, in the three main regions of Vietnam (figure 1). 500 g were randomly sampled and identified according to their use for human food or animal feed. All samples were of “commercial grade”. Samples were collected in July 2005 and corresponded to 2004 harvests.

Fungal count and identification

Twenty grams of sample were dispersed in 180 ml of 0.05% Tween 80 solution using a Warring Blender. 1 ml of each decimal dilution was plated on both malt agar medium (2% agar, 2% malt, 50 ppm chloramphenicol) and NaCl added malt agar medium (malt agar + 6% NaCl). Typical fungal colonies were counted after 3, 5 and 7 days of culture at 25 and 31°C. *Aspergillus* and *Fusarium* were then identified to species level according to Pitt (1988) Raper and Fennell (1965) and Botton (1990). *Aspergillus*, *Fusarium* and certain *Penicillium* strains were isolated from plates by plating out several times. In order to evaluate the depth of the fungal contamination, grains were superficially disinfected with diluted bleach (10%) and then dried before analysis.

Quantification of mycotoxins:

Aflatoxin B1 quantification was performed by fluorimetry after separation by thin layer chromatography according to ISO method 6651:2001 (ISO, 2001). Briefly, aflatoxins were extracted by 100 ml acetonitrile-KCl (5% in water) (90:10). 25 ml of the filtered extract was de-fatted twice with 12.5 ml of isooctane. New extract was then extracted with chloroform (vol:vol). After filtration on phase separator, the chloroformic phase was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen. The dry extract was dissolved in toluene-acetonitrile (98:2) and 3µl were spotted on TLC plates. Extracts were separated by development of TLC plates in Ether-methanol-water (6:3:1, vol/vol/vol), and quantified by fluorodensitometry at 365 nm using a Shimadzu CS930 fluorodensitometer (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). Quantification was done by comparison with known amounts of standard spotted on the same plate (Shotwell *et al.*, 1981). The limit of quantification was 2.5 ng/g.

Fumonisin B1 was quantified in samples by HPLC according to AFNOR Norm NF EN 13585 as previously described (AFNOR, 2002; Bailly *et al.*, 2005). For that, 25 µl of the extracts or 25 µl of standard were derivatized with a mixture of 25 µl of borate buffer (pH 8.3), 25 µl of water and 25 µl of O-phthaldialdehyde (15 mM) and separated by HPLC using an M2200 (ICS, Toulouse, France) pump, a Prontosil C18, 5 µm, 250x4mm column equipped with a pre-column (ICS, Toulouse, France), and a 8450 fluorescence HPLC-monitor (Shimadzu, Kyoto, Japan). The operating conditions were as follows: liquid phase: NaH₂PO₄ (0.1M pH 3.3)/ Methanol 25/75 (v/v); flow rate: 1 ml/min; injection volume: 10 µl; Excitation 335 nm and Emission 440 nm. Quantification was done by measuring peak area with a Pic3 data system from ICS (Toulouse, France) and comparing with standard calibration curve. The mean retention time was 7, 5 min. Limits of quantification was 100 ng/g for FB1 (Rice *et al.*, 1995; AFNOR, 2002).

Results

Fungal mycoflora

Mould counts of samples are listed in Tables 1 and 2. Total fungal contamination was about 7×10^5 and 4×10^6 CFU/g for maize intended for human and animal consumption respectively. Significant individual variations in mould contamination were observed between samples but there was no correlation with their geographic origin.

Identification of fungal strains revealed that *Aspergillus* was the most frequent genus, found in all maize samples (100%), whatever their geographic origin or their intended use (tables 3 and 4). Eight different species of *Aspergillus* were found: *A. flavus*, *A. niger*, *A. ornatus*, *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. restrictus* and *A. ochraceus*.

Aspergillus flavus was the most frequent species, found in all but two samples. Levels of contamination by *A. flavus* varied considerably depending on the samples but there was no clear correlation with other known parameters of the samples. For other *Aspergillus* species, the frequency of contamination was lower and some differences were observed depending on the intended use of the maize. For example, *A. wentii* was observed in 46% of samples of maize destined for animal feed whereas it was never found in samples destined for human consumption. In contrast, *A. ornatus* was found in more than 60% of maize destined for human consumption whereas it was present in only 16% of maize destined for animal feed. *A. glaucus* was also observed more frequently in maize for human consumption than for animal feed (54 and 33% respectively).

Other fungal strains were found in Vietnamese maize samples at a lower frequency. Although three samples showed high levels of contamination by *Penicillium*, this fungal genus was only found in 53% of samples (tables 3 and 4).

Fusarium strains were observed in 23% of samples. Superficial disinfection of maize grains did not allow the isolation of other *Fusarium* species. The average level of contamination with *Fusarium verticilloides* was of 10^4 CFU/g.

Mucorales were observed in 23% of samples and yeasts were found in about 40% of samples.

Mycotoxin contamination

The results of aflatoxin B1 and fumonisin B1 quantification in samples are listed in Tables 1 and 2.

Aflatoxin B1 was found in 17 samples out of 25 (68%). Five samples presented aflatoxin B1 levels below $10 \mu\text{g}/\text{kg}$. Ten samples were found contaminated by concentrations of mycotoxin

ranging from 11 to 50 µg/kg. Two samples showed higher contamination levels of 98 and 126 µg/kg. All samples containing more than 50 µg/kg were destined for animal feed. Ten out of 13 samples of maize intended for human consumption were contaminated. The level of contamination appeared to be lower since only one sample was contaminated with more than 15 µg/kg AFB1. Generally, the samples that were highly contaminated with aflatoxins were those in which the fungal count was the highest. Two samples showed high levels of contamination with 47.2 and 31.1 ng AFB1/g but only moderate fungal counts of 705 and 3.2 10³ CFU/g respectively. But in these two cases *Aspergillus flavus* was the most frequent species, representing more than 95% of the fungal flora of these samples.

Fumonisin B1 contamination was found in eight out of 25 samples (tables 1 and 2). Measured amounts of Fumonisin ranged from 0.5 to 3.2 mg/kg, with an average level of 1.1 mg/kg. There was no clear correlation with geographic origin or with the intended use of samples.

Discussion

Vietnam is located at the extremity of the Indochina peninsula, bordered by Laos and the gulf of Tonkin. It is thus located in both tropical and sub-tropical zones and its climate is as a whole characterized by both strong sunshine and high rainfall. This kind of climate is known to be very favourable to mould development, especially of thermo-tolerant species such as *Aspergillus* (Rapper and Fennell, 1965). These species are usually the main fungal contaminants in Asia and are responsible for both crop spoilage and mycotoxin contamination of foodstuffs (Takahashi *et al.*, 2004; Erlich *et al.* 2007; Gao *et al.*, 2007). However, Vietnam is a long narrow that extends nearly 2000 km from north to south but only 200 km from east to west, and there are consequently considerable differences in climate depending on the region. In the north of Vietnam, the temperatures are quite constant throughout the year, with a mean air temperature of 24°C. In the south of Vietnam, the climate is sub-equatorial, with two main seasons: a dry season, in which temperatures can go up to 40°C with a very humid atmosphere; and a rainy season, from May till November. The climate in central Vietnam is intermediate between the north and the south (Sullivan, 2006). As a result, Vietnam is of special interest to evaluate the effect of climate on fungal contamination. For this reason, we took samples in the north, the centre, and the south (see figure 1). Surprisingly, no marked differences were observed between the samples with respect to both total fungal contamination and fungal species. These results are in agreement with those of another study

done on Vietnamese rice (Tran *et al.*, 2001). In contrast, fungal mycoflora of maize samples from Vietnam differed considerably from those reported in the few available studies concerning the mycological quality of cereals grown in Europe, but also America. This observation may be related to both climatic conditions during plant growth and harvest, and to drying and storage procedures during the post-harvest period. Indeed, *Fusarium* is usually the main genus observed in maize grown in Europe or USA (Gutema *et al.*, 2000; Domijan *et al.*, 2005; Arino *et al.*, 2007) whereas *Aspergillus* fungi were found to be major contaminant of Vietnamese maize, as reported in other hot and wet regions of the world (Asia, South America and equatorial Africa) (Lee *et al.*, 1986; Janardhana *et al.*, 1999; Pacin *et al.*, 2003; Kaaya and Kyamuhangire, 2006; Magnoli *et al.*, 2006). *Aspergillus flavus* was found to be the major contaminant of maize samples, whatever their geographical origin.

Nevertheless, differences in fungal mycoflora were noted between samples intended for animal feed or for human consumption. In maize destined for animal feed, *A. wentii* was frequently found whereas it was never found in maize for human consumption. Conversely, *A. ornatus* and *A. glaucus* were found more often in samples for human consumption. These differences may be related to differences in drying procedures and storage after harvest. *A. glaucus* and *A. ornatus* are xerophilic species which develop more easily on dry substrates whereas *A. wentii* needs more moisture to grow (Rapper and Fennell, 1965).

Fusarium was found to be a minor contaminant of Vietnamese maize, being observed in only 23% of samples, whereas in Europe, a prevalence of near 100% of contamination with this mould genus is often reported. Moreover the only *Fusarium* species found in the samples we analysed was *Fusarium verticillioides* whereas the presence of other *Fusarium* species such as *F. graminearum*, *F. culmorum* or *F. equiseti* is often reported in other part of the world (Pacin *et al.*, 2003; Domijan *et al.*, 2005; Isebaert *et al.*, 2005; Arino *et al.*, 2007; Adejumo *et al.*, 2007; Morales-Rodriguez *et al.*, 2007).

Because it is known that a high proportion of *A. flavus* strains is able to produce aflatoxins (Moreno and Suarez-Fernandez, 1986; Gabal *et al.*, 1994; Giorni *et al.*, 2007) and *Fusarium verticillioides* is known to be able to produce fumonisins during the peri-harvest period (Le Bars *et al.*, 1994; Miller, 2001; Marin *et al.*, 2004), aflatoxin B1 and fumonisin B1 were also quantified in our maize samples.

Aflatoxin B1 was quantified in all samples using thin layer chromatography. For that, we used a method normalized in 2001. It allows a limit of quantification of 2.5 ng/g that is below the most constraining regulatory limit for AFB1 in cereals (FAO, 2004). Moreover, TLC has the advantage of permitting detection over a wide range of concentrations.

The prevalence of contamination and the levels of aflatoxin B1 we observed in our maize samples from Vietnam are in agreement with older data available on cereal contamination by this mycotoxin in this country (Wang *et al.*, 1995; Son *et al.*, 1998) and in other countries with the same climatic conditions (Yoshizawa *et al.*, 1996; Bhat *et al.*, 1997; Ali *et al.*, 1998; Toteja *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006) However, it is important to note that in Vietnam, the regulatory limits for this mycotoxin are 10 µg/kg in whereas in Europe, they are 2 µg/kg for maize intended for human and 20 µg/kg for animal consumption (FAO, 2004). Consequently, many samples corresponding to maize used for human food should be withdrawn. However, due to the demand for cereals for human consumption, it is unlikely that such screening is regularly performed. The contamination of maize intended for human consumption with aflatoxin B1 is a great public health concern and it is important to highlight that primary liver cancer is one of the most frequent malignancies in Vietnam, more than 90% of liver cancer being hepatocellular carcinoma (Ha, 1997).

In the same way, many samples intended for animal feed exceeded regulatory values. Moreover, samples containing 50 to 100 µg/kg AFB1 could lead to subacute toxicity if fed to animals (Dilkin *et al.*, 2003; Hamilton, 1971; Hamilton, 1975).

Prevalence of Fumonisin B1 contamination was less frequent than Aflatoxin B1, only 30% of samples being found contaminated with this mycotoxin. This result is in agreement with data available on maize contamination by fumonisins in Southeast Asia region, the frequency of contamination being around 50% of samples (Yamashita *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995; Yoshizawa *et al.*, 1996). These results contrast with those reported in studies done in other part of the world, and especially in European countries or USA, where fumonisin contamination prevalence usually ranges from 70 to 100% of samples analysed (Castello *et al.*, 1998; Gonzalez *et al.*, 1999; Solovey *et al.*, 1999; Gutema *et al.*, 2000; Nikiema *et al.*, 2004, Pietri *et al.*, 2004; Domijan *et al.*, 2005; Engelhardt *et al.*, 2006). Moreover, the amounts of Fumonisin detected can be considered as moderate (ranging from 0.5 to 3.2 mg/kg) in comparison to levels reported in other countries (Doko and Visconti, 1994; Hirooka *et al.*, 1996; Castello *et al.*, 1998). For most of the samples analysed, levels of contamination are in agreement with JECFA recommendations concerning human exposure to fumonisins (JECFA, 2001).

Nevertheless, it should be noted that seven samples were found co-contaminated by aflatoxin B1 and fumonisin B1. Since the former is an important cancer initiator and the later, at least in animals, may act as a cancer promoter, the simultaneous exposure to these two toxic agents

may be of public health concern and raises the question of the possible addition or synergy of the two mechanisms of action (Mc Kean *et al.*, 2006).

In conclusion, this study demonstrated that *Aspergillus flavus* is a very frequent contaminant of Vietnamese maize and may lead to contamination of this food by AFB1. Due to the levels of mycotoxin observed, it is important to undertake controls and to sort maize for human or animal feed depending on the mycotoxin content.

Acknowledgments

This work was financed by a grant from the AUF (Agence Universitaire de la Francophonie): PSCI n°: 6313 PS578.

References

Adejumo, T.O., Hettwer, U., and Karlovsky, P. 2007. Occurrence of *Fusarium* species and trichothecenes in Nigerian maize. *International Journal of Food Microbiology* 116: 350-357.

AFNOR NF EN 13585, 2002. Dosage des fumonisines B1 et B2 dans le maïs, AFNOR ed., Paris.

Ali, N., Yamashita, A., and Yoshizawa, T., 1998. Natural co-occurrence of aflatoxins and fusarium mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia. *Food Additives & Contaminants* 15: 377-384.

Arino, A., Juan, T., Estopanan, G., and Gonzalez-Cabo, J.F., 2007. Natural occurrence of *Fusarium* species, fumonisin production by toxigenic strains and concentration of fumonisins B1, and B2 in conventional and organic maize grown in Spain. *Journal of Food Protection* 70: 151-156.

Bailly, J.D., Querin, A., Tardieu, D., and Guerre, P., 2005. Production and purification of fumonisins from a highly toxigenic strain of *Fusarium verticillioides* strain. *Revue de Médecine Vétérinaire* 156: 547-554.

Bennett, J.W., and Klich M., 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 497-516.

Bhat, R.V., Vasanthi, S., Rao, B.S., Rao, V.S., Nagaraja, K.V., Bai, R.G., Prasad, C.A., Vanchinathan, S., Roy, R., Saha, S., Mukherjee, A., Ghosh, P.K., Tojeta, G.S., and Saxena, B.N., 1997. Aflatoxin B1 contamination in maize samples collected from different geographical regions of India. *Food Additives & Contaminants* 14 : 151-156.

Botton, B. *et al.*, 1990. Moisissures utiles et nuisibles: importance industrielle, 2^{ème} ed. Masson ed, Paris.

- Castello, M.M., Sumner, S.S., and Bullerman, L.B., 1998. Occurrence of fumonisins in corn-based food products. *Journal of Food Protection* 61: 704-707.
- Dilkin, P., Zorzete, P., Mallmann, C.A., Gomes, J.D., Utiyama, C.E., Oetting, L.L., and Correa, B., 2003. Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B1 and fumonisin B1 containing *Fusarium moniliforme* culture material in weaned piglets. *Food Chemical Toxicology* 41: 1345-1353.
- Doko, M.B., and Visconti, A., 1994. Occurrence of fumonisins B1 and B2 in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. *Food Additives & Contaminants* 11: 433-439.
- Domijan, A.M., Peraica, M., Cvjetkovic, B., Turcin, S., Jurjevic, Z., and Ivic, D., 2005. Mould contamination and co-occurrence of mycotoxins in maize grain in Croatia. *Acta Pharmacologica* 55: 349-356.
- Domijan, A.M., Peraica, M., Jurjevic, Z., Ivic, D., and Cvjetkovic, B., 2005. Fumonisin B1, fumonisin B2, zearalenone and ochratoxinA contamination of maize in Croatia. *Food Additives & Contaminants* 22: 677-680.
- Ehrlich, K.C., Kobbeman, K., Montalbano, B.G., and Cotty, P.J., 2007. Aflatoxin producing *Aspergillus* species from Thailand. *International Journal of Food Microbiology* 114: 153-159.
- Fandohan, P., Gnonionfin, B., Hell, K., Marasas, W.F., and Wingfield, M.J., 2005. Natural occurrence of *Fusarium* and subsequent fumonisin contamination in preharvest and stored maize in Benin. *International Journal of Food Microbiology* 99: 173-183.
- FAO, 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. *FAO food and nutrition papers*, Rome, Italy, 81, 183 pp.
- Gabal, M.A., Hegasi, S.A., and Hassanin, N., 1994. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* field isolates. *Veterinary and Human Toxicology* 36: 519-521.
- Gao, J., Liu, Z., and Yu, J., 2007. Identification of *Aspergillus* section *flavi* in maize in northeastern China. *Mycopathologia*, 11: 91-95.
- Gelderblom, W.C., Abel, S., Smuts, C.M., Marnewick, J., Marasas, W.F., Lemmer, E.R., and Ramijak, D., 2001. Fumonisin induced hepatocarcinogenesis: mechanisms related to cancer initiation and promotion. *Environmental Health Perspectives* 109: 291-300.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T., and Battilani, P., 2007. Studies on *Aspergillus* section *flavi* isolated from maize in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology* 113: 330-338.
- Gonzalez, H.H., Martinez, E.J., Pacin, A.M., Resnik, S.L., and Sydenham, E.W., 1999. Natural co-occurrence of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins in field trial corn in Argentina. *Food Additives & Contaminants* 16: 565-569.
- Gutema, T., Munimbazi, C., and Bullerman, L.B., 2000. Occurrence of fumonisins and moniliformin in corn and corn-based food products of U.S. origin. *Journal of Food Protection* 63:1732-1737.

Ha, M.V., 1997. Some particularities of hepatobiliary diseases in Vietnam. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 12: S15-18.

Hamilton, P.B., 1971. A natural and extremely severe occurrence of aflatoxicosis in laying hens. *Poultry Science* 50: 1880-2.

Hamilton, P.B., 1975. Proof of mycotoxicoses being a field problem and a simple method for their control. *Poultry Science* 54: 1206-1208.

Hirooka, E.Y., Yamaguchi, M.M., Aoyama, S., Sugiura, Y., and Ueno, Y., 1996. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. *Food Additives & Contaminants* 13: 173-183.

Hussein, H.S., and Brasel, J.M., 2001. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on human and animals. *Toxicology* 167: 101-134.

IARC, 1993. Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, in *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. World health organization, Lyon, 56, 245 pp.

Isebaert, S., Haesaert, G., Devreese, R., Maene, P., Fremaut, F., and Vlaemynck, G., 2005. *Fusarium* spp and *Fusarium* mycotoxins in maize: a problem for Flanders? *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 70: 129-136.

International Standardization Organisation, 2001. Norm 6651:2001. Dosage semi-quantitatif de l'aflatoxine B1. ISO publishing, Switzerland, 13 pp.

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

JECFA, 2001. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-six report. WHO Technical Report Series, Geneva, 47.

Kaaya, A.N., and Kyamuhangire, W., 2006. The effect of storage time and agroecological zone on mould incidence and aflatoxin contamination of maize from traders in Uganda. *International Journal of Food Microbiology* 110: 217-223.

Le Bars, J., Le Bars, P., Dupuy, J., Boudra, H., and Cassini, R., 1994. Biotic and abiotic factors in fumonisin B1 production and stability, *Journal of AOAC International* 77: 517-521.

Le Bars, J., and Le Bars, P., 1996. Recent acute and subacute mycotoxicoses recognized in France. *Veterinary Research* 27: 383-394.

Lee, U.S., Jang, H.S., Tanaka, T., Toyasaki, N., Sugiura, Y., Oh, Y.J., Cho, C.M., and Ueno, Y., 1986. Mycological survey of Korean cereals and production of mycotoxins by *Fusarium* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 52: 1258-1260.

Mace, K., Aguilar, F., Wand, J.S., Vautravers, P., Gomez-Lechon, M., Gonzalez, F.J., Groopman, J., Harris, C.C., and Pfeifer, A.M., 1997. Aflatoxin B1 induced adduct formation

and p53 mutations in CYP450 expressing human liver cell lines. *Carcinogenesis* 18: 1291-1297.

Magnoli, C., Hallak, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Chiacchiera, S., and Dalcero, A.M. 2006. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in commercial corn kernels in Argentina. *Mycopathologia*, 161: 53-58.

Marin, S., Magan, N., Ramos, A.J., and Sanchis, V., 2004. Fumonisin producing strains of *Fusarium*: a review of their ecophysiology. *Journal of Food Protection* 67: 1792-1805.

Mc Kean, C., Tang, L., Billam, M., Wang, Z., Theodorakis, C.W., Kendall, R.J., and Wand, J.S., 2006. Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in animals and human cells. *Food Chemical Toxicology* 44: 868-876.

Miller, J.D., 2001. Factors that affect the occurrence of fumonisin. *Environmental Health Perspectives* 109: 321-324.

Morales-Rodriguez, I., Yanez-Morales, Mde J., Silva-Rojas, H.V., Garcia de Los Santos, G., and Guzman de Pena, D.A., 2007. Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico associated with ear rot in maize and their identification using a phylogenetic approach. *Mycopathologia* 163: 31-39.

Moreno Romo, M.A., and Suarez Fernandez, G., 1986. Aflatoxin producing potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from Spanish poultry feeds. *Mycopathologia* 95: 129-132.

Nikiema, P.N., Worrillow, L., Traore, A.S., Wild, C.P., and Turner, P.C., 2004. Fumonisin contamination of maize in Burkina Faso, West Africa. *Food Additives & Contaminants* 21: 865-870.

Pacin, A.M., Gonzalez, H.H., Etcheverry, M., Restnik, S.L., Vivas, L., and Espin, S., 2003. Fungi associated with food and feed commodities from Ecuador. *Mycopathologia* 156: 87-92.

Pfohl-Leskowicz, A., and Manderville, R.A., 2007. Ochratoxin A toxicity: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research* 51: 61-69.

Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L., and Piva, G., 2004. Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in northern Italy. *Food Additives & Contaminants* 21: 479-487.

Pitt, J.L., 1988. Laboratory guide to common *Penicillium* species. Academic Press, London,

Rapper, K.B., and Fennell, D.I., 1965. The genus *Aspergillus*, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.

Rice, L.G., Ross, P.F., and Dejong, J., 1995. Evaluation of a liquid chromatographic method for the determination of fumonisins in corn, poultry feed, and *Fusarium* culture material. *Journal of AOAC International* 78: 1002-1009.

Riley, R.T., Enongene, E., Voss, K.A., Norred, W.P., Meredith, F.I., Sharma, R.P., Spitsbergen, J., Williams, D.E., Carlson, D.B., and Merrill, A.H., 2001. Sphingolipid perturbation as mechanism for fumonisin carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* 109: 301-308.

Sangare-Tigori, B., Dem, A.A., Kouadio, H.J., Betbeder, A.M., Dano, D.S., Moukha, S., and Creppy, E.E., 2006. Co-occurrence of aflatoxin B1, fumonisin B1, ochratoxin A and zearalenone in cereals and peanuts from Cote d'Ivoire. *Human & Experimental Toxicology* 25: 211-216.

Schothorst, R.C., and Van Egmond, H.P., 2004. Report from SCOOP task 3.2.10 "collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the EU member states". Subtask: trichothecenes. *Toxicology Letters* 153: 133-143.

Shotwell, O.L., Burg, W.R., and Diller, T., 1981. Thin layer chromatographic determination of aflatoxin in corn dust. *Journal of AOAC international* 64: 1060-1063.

Solovey, M.M., Somoza, C., Cano, G., Pacin, and A., Resnik, S., 1999. A survey of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins contamination in corn based food products in Argentina. *Food Additives & Contaminants* 16: 325-329.

Son, C.P.N., Anh, P.T., Hao, L.B., Huong, H.T., Duy, K.H.D., Anh, L.Q., and Blanc, M., 1998. Enquête sur la contamination par les aflatoxines des produits agricoles et agro-alimentaires au sud vietnam. *Revue de Medecine Veterinaire* 149 : 705.

Sullivan, J., 2006. Vietnam. National Geographic Publishers, 400 pp.

Tabahashi, H., Kamimura, H., and Ichinoe, M., 2004. Distribution of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in sugarcane fields in the southernmost island of Japan. *Journal of Food Protection* 67: 90-95.

Thanh Ha, D., Dinh Thao, T., Tri Khiem, N., Xuan Trieu, M., Gerpacio, R.V., and Pingali, P.L., 2004. Maize in Vietnam: Production Systems, Constraints, and Research Priorities. Mexico, D.F., 50 pp.

Tojeta, G.S., Mukherjee, A., Diwakar, S., Singh, P., Saxena, B.N., Sinha, K.K., Sinha, A.K., Kumar, N., Nagaraja, K.V., Bai, G., Prasad, C.A., Vanchinathan, S., Roy, R., and Parkar, S., 2006. Aflatoxin B1 contamination in wheat grain samples collected from different geographical regions of India: a multicenter study. *Journal of Food Protection* 969: 1463-1467.

Tran, S.T., Bailly, J.D., Querin, A., Le Bars, P., and Guerre, P., 2001. Fungal contamination of rice from south Vietnam, mycotoxinogenesis of selected strains and residues in rice. *Revue de Medecine Veterinaire* 152: 555-560.

Wang, D.S., Liang, Y.X., Nguyen, T.C., Le, D.D., Tanaka, T., and Ueno, Y., 1995. Natural co-occurrence of Fusarium toxins and aflatoxin B1 in corn for feed in North Vietnam. *Natural Toxins* 3: 445-449.

Wang, J., and Liu, X.M., 2006. Surveillance on contamination of total aflatoxins in corn, peanut, rice, walnut and pine nut in several Area in China. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 40: 33-37.

Yamashita, A., Yoshizawa, T., Aiura, Y., Sanchez, P.C., Dizon, E.I., Arim, R.H., and Sardjono, S., 1995. Fusarium mycotoxins (fumonisins, nivalenol, and zearalenone) and aflatoxins in corn from Southeast Asia. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry* 59 : 1804-1807.

Yoshizawa, T., Yamashita, A., and Chokethaworn, N., 1996. Occurrence of fumonisins and aflatoxins in corn from Thailand. *Food Additives & Contaminants* 13: 163-168.

Zinedine, A., Juan, C., Soriano, J.M., Molto, J.C., Idrissi, L., and Manes, J., 2007. Limited survey for the occurrence of aflatoxins in cereals and poultry feeds from Rabat, Morocco. *International Journal of Food Microbiology* 115: 124-127.

Figure 1: sampling sites in Vietnam. Maize samples intended for human (ν) or animal (λ) consumption were taken randomly from public markets.

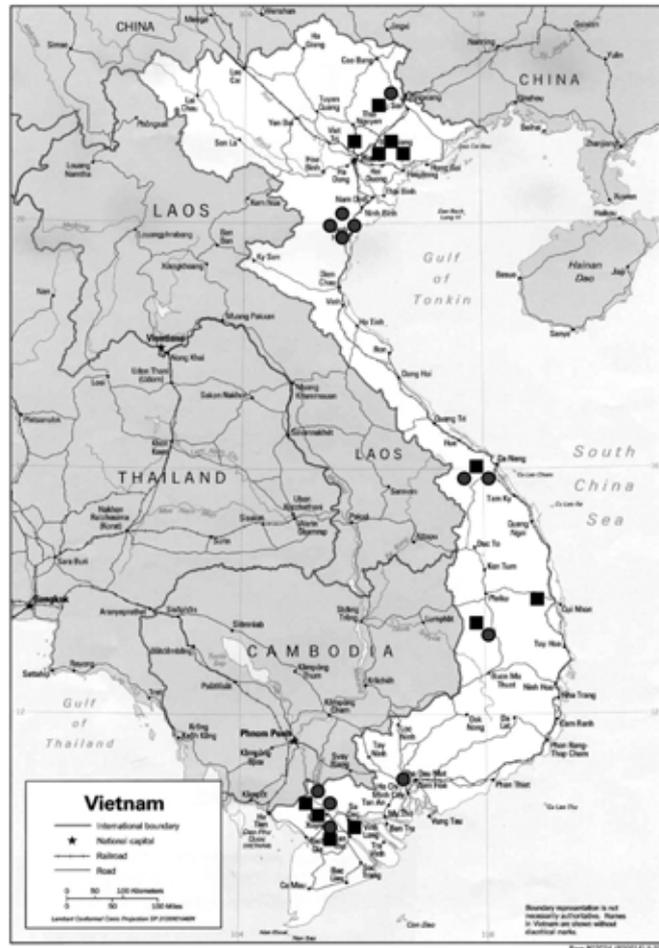


Table 1: fungal mycoflora and mycotoxin contamination of maize samples intended for human consumption depending on their geographic origin

	North						Centre			South			
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13
Total mycoflora^a	154.2	401	4030	32.3	305.3	148	3366	55.1	111.4	2.6	305	391	3.5
<i>Aspergillus flavus^a</i>	10	0.4	10	NF	2	70	6	2	1	0.1	1.5	1	3
Aflatoxin B1^b	11.8	2.1	14.9	6.5	5.5	23	11.3	8.9	ND	ND	12.3	ND	31.1
<i>Fusarium verticillioides^a</i>	130	0.4	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	2	NF	NF	NF
Fumonisin B1^b	600	1150	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	500

a: x10³ CFU/g; b: µg/kg; ND: not detected (<2 µg/kg for AFB1 and < 100 µg/kg for FB1); NF: not found

Table 2: fungal mycoflora and mycotoxin contamination of maize samples intended for animal feed depending on their geographic origin

	North						Centre						South												
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	
Total mycoflora^a	341	8000	2000	1900	370	10.2	6.5	71	35000	705	97	129													
<i>Aspergillus flavus^a</i>	30	NF	1900	200	40	0.8	0.2	1	400	700	90	13													
Aflatoxin B1^b	ND	ND	126.5	98.4	15.1	ND	ND	21.1	43.2	47.2	ND	7													
<i>Fusarium verticillioides^a</i>	NF	NF	NF	NF	NF	4	2.2	NF	10	NF	NF	2													
Fumonisin B1^b	ND	ND	ND	3300	ND	ND	ND	ND	400	1050	1120	850													

a: x10³ CFU/g; b: µg/kg; ND: not detected (< 2 µg/kg for AFB1 and < 100 µg/kg for FB1); NF: not found

Table 3: Contamination of maize samples intended for human food by fungal species. Results are expressed as % of contaminated samples

	Origin			Total (%)
	North	Centre	South	
<i>Aspergillus</i>	100	100	100	100
<i>A. flavus</i>	80	100	100	92
<i>A. niger</i>	80	100	100	77
<i>A. wentii</i>	0	0	0	0
<i>A. glaucus</i>	40	60	60	54
<i>A. ochraceus</i>	20	0	20	23
<i>A. restrictus</i>	40	30	0	23
<i>A. ornatus</i>	40	65	80	61
<i>A. candidus</i>	60	65	20	46
<i>Fusarium</i> ^a	40	0	20	23
<i>Penicillium spp.</i> ^b	60	100	20	53
<i>Other</i> ^c	20	66	20	23

a : only *Fusarium verticillioides* isolates were present in analysed samples

b : *Penicillium* isolates were not identified at species level

c : Mucorales, *Acremonium*, *Hemispora*

Table 4: Contamination of maize samples intended for animal feed by fungal species. Results are expressed as % of contaminated samples

	Origin			Total (%)
	North	Centre	South	
<i>Aspergillus</i>	100	100	100	100
<i>A. flavus</i>	80	100	100	91
<i>A. niger</i>	60	65	75	67
<i>A. wentii</i>	40	66	25	42
<i>A. glaucus</i>	60	30	0	33
<i>A. ochraceus</i>	20	30	25	25
<i>A. restrictus</i>	0	30	25	17
<i>A. ornatus</i>	20	30	0	16
<i>A. candidus</i>	0	30	25	16
<i>Fusarium spp.</i> ^a	0	66	50	33
<i>Penicillium spp.</i> ^b	60	66	25	50
<i>Other</i> ^c	20	0	25	16

a : only *Fusarium verticillioides* isolates were present in analysed samples

b : *Penicillium* isolates were not identified at species level

c : Mucorales, *Acremonium*, *Hemispora*

Discussion

Notre étude a montré que la flore fongique du maïs produit au Vietnam est proche de celle décrite dans les enquêtes réalisées sur ce substrat dans d'autres pays d'Asie ou dans des pays proches de la zone équatoriale (Amérique du Sud, Afrique équatoriale) (Janardhana *et al.*, 1999 ; Pacin *et al.*, 2003 ; Takahashi *et al.*, 2004 ; Kaaya and Kyamuhangire, 2006 ; Magnoli *et al.*, 2006 ; Erlich *et al.*, 2007 ; Gao *et al.*, 2007). Ainsi, la flore fongique est dominée par la présence d'espèces fongiques appartenant au genre *Aspergillus*, et plus particulièrement *Aspergillus flavus*. Il faut souligner que, de façon assez surprenante, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence marquante de la flore fongique en fonction de l'origine géographique des échantillons, et ce, malgré les différences climatiques pouvant exister entre le nord et le sud du pays.

Par contre, des différences ont pu être observées en fonction de l'utilisation attendue de cette matière première. A titre d'illustration, *A. wentii* apparaît être un contaminant fréquent du maïs destiné à l'alimentation animale alors qu'il n'est jamais présent dans le maïs destiné à l'alimentation humaine. A l'inverse, des espèces comme *A. glaucus* et *A. ornatus* semblent plus fréquent dans les échantillons destinés à l'alimentation humaine. Ces différences peuvent être liées à des différences dans les procédures de séchage puis de stockage de ces aliments. En effet, *A. glaucus* et *A. ornatus* sont des espèces xérophiles qui se développent plus facilement sur des substrats dont l'activité hydrique est faible (Rapper et Fennell, 1965).

L'analyse de la flore fongique du maïs produit au Vietnam a aussi montré que les *Fusarium* sont des contaminants moins importants dans ce pays par rapport à ce que l'on peut observer en Europe. De plus, la seule espèce de *Fusarium* que nous avons mis en évidence était le *Fusarium verticillioides* alors que, généralement, le maïs est aussi fréquemment contaminé par d'autres espèces telles que *F. graminearum*, *F. culmorum* ou *F. equiseti* (Pacin *et al.*, 2003 ; Domijan *et al.*, 2003 ; Isebaert *et al.*, 2005 ; Arino *et al.*, 2007 ; Adejumo *et al.*, 2007 ; Morales-Rodriguez *et al.*, 2007).

Compte tenu de la nature de la flore fongique présente sur les échantillons analysés, nous avons quantifié la contamination du maïs par l'aflatoxine B1 et la fumonisine B1.

Ces analyses ont montré que de nombreux échantillons sont contaminés par l'aflatoxine B1 (68%), à des niveaux supérieurs aux réglementations nationales (Vietnam) ou internationales (Europe). Ce résultat est particulièrement important en termes de santé publique puisque de nombreux échantillons destinés à l'alimentation humaine ne sont pas conformes à cette législation et ne devraient donc pas être utilisés. Toutefois, il est fort probable que les

nécessités d'approvisionnement des marchés en céréales ne permettent pas un tel tri des matières premières en fonction de leur teneur en mycotoxine. Il faut d'ailleurs souligner que les cancers primaires du foie sont une pathologie majeure au Vietnam et que 90% de ces tumeurs sont des carcinomes hépatocellulaires, qui sont les types tumoraux rapportés après exposition prolongée à l'AFB1 (Ha, 1997, IARC, 1993).

La fréquence de contamination par la fumonisine B1 apparaît plus faible (30% des échantillons). Nos résultats sont en accord avec des études antérieures sur la prévalence de cette molécule dans le maïs produit en Asie du Sud Est (Yamashita *et al.*, 1995 ; Wang *et al.*, 1995 ; Yoshizawa *et al.*, 1996). De plus, le niveau de contamination observé apparaît comme modéré puisque, pour la plupart des échantillons, il est en accord avec les recommandations du JECFA concernant l'exposition humaine aux fumonisines (JECFA, 2001).

Toutefois, il convient de noter que 7 échantillons ont été trouvés contaminés à la fois par l'aflatoxine B1 et la fumonisine B1. Puisque l'AFB1 est un puissant initiateur de cancers et que la FB1 semble avoir des propriétés promotrice de tumeur, l'exposition simultanée à ces molécules soulève la question d'un possible effet synergique de ces composés toxiques (Mc Kean *et al.*, 2006).

Article 3

Flore fongique des salaisons sèches commercialisées en France

Introduction

Le problème de la contamination fongique et mycotoxique des produits céréaliers et leur implication dans l'exposition humaine à ces contaminants est bien connu. Le problème de la contamination fongique et mycotoxique des produits d'origine animale et leur possible rôle dans l'exposition directe des consommateurs est moins souvent évoqué.

En effet, le développement fongique observé sur certains aliments comme les fromages ou les produits de salaison sèche est particulièrement important pour l'acquisition des qualités organoleptiques. Ces microorganismes ont un rôle antioxydant et participent au maintien de la couleur. Ils protègent la surface des aliments et limitent les phénomènes de déshydratation ou au contraire de prolifération bactérienne. Ils participent au développement des caractéristiques organoleptiques du produit fini, grâce à leur potentiel enzymatique (lipolyse, protéolyse). Enfin, ils confèrent aussi au produit son aspect typique, recherché par les consommateurs (Desmazeaud *et al.*, 1976 ; Philips *et al.*, 1988 ; Rodriguez *et al.*, 1998).

Ce développement fongique indispensable pose donc le problème de la synthèse potentielle de mycotoxines sur ce type de substrats.

Dans le cas de la fromagerie, les produits sontensemencés avec des souches pures dont l'absence de potentiel toxinogène est contrôlé avant utilisation (Le Bars *et al.*, 1979 ; Engel *et al.*, 1989 ; Le Bars *et al.*, 1998). Aussi, tout développement d'une flore contaminante est, le plus souvent, facilement détectable et entraîne la mise en place de mesures correctives.

La flore fongique des produits de salaison est en général plus complexe. En effet, les rares études ayant visé à analyser la flore fongique de ces produits montrent, en général, la coexistence de nombreuses espèces appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* (Wu *et al.*, 1974 ; Rojas *et al.*, 1991 ; Nunez *et al.*, 1996 ; Lopez-Diaz *et al.*, 2001 ; Mizakova *et al.*, 2002). Ils s'agit de microorganismes présents dans les locaux d'affinage et qui vont pouvoir se développer de manière plus ou moins importante sur les produits carnés en fonction des conditions environnementales (température, hygrométrie des locaux) et du procédé de fabrication (durée de l'affinage, teneur en sel, utilisation de ferments fongiques, nature des locaux d'affinage,...) (Battilani *et al.*, 2007).

Malgré l'importance des produits de salaison sèche dans les habitudes culinaires françaises, aucune étude n'avait été faite pour caractériser la flore fongique des produits fabriqués en France, les études antérieures ayant été réalisées sur des productions espagnoles ou allemandes.

L'objectif de ce travail a donc été de caractériser la flore fongique de produits de salaison sèche commercialisés en France et de déterminer le potentiel toxigène des souches fongiques isolées. Compte tenu du nombre d'échantillons analysés, cette étude ne prétend pas être exhaustive et représentative de la flore fongique de l'ensemble des produits commercialisés en France. Elle se veut être une étude préliminaire destinée à évaluer la pertinence et la nécessité éventuelle de réaliser des enquêtes plus approfondies dans ce domaine.

Toxigenic potential of fungal mycoflora isolated from dry cured meat products: preliminary study

TABUC C^{oo}, BAILLY JD^{oo}, BAILLY S^{oooo}, QUERIN A^{oo}, GUERRE P^{oo}

^{oo} UPSP mycotoxicologie, Ecole Nationale Vétérinaire, 23 chemin des capelles, 31076 Toulouse cedex
^{oooo} Myco 2B, BP4, 31170 Tournefeuille

SUMMARY

Fungal development on the surface of dry cured meat products actively participates to acquisition and improvement of organoleptic qualities of these products. However, uncontrolled development of contaminant mycoflora may also lead to alteration of the aspect of products and synthesis of mycotoxins. This preliminary study was done to evaluate fungal mycoflora of French cured meat products and to investigate the toxigenic potential of isolated strains. Thirty seven isolates belonging to 12 *Penicillium* species were identified. Eighteen strains are reported in literature as toxin producers. They were tested for ochratoxin A, citrinin and cyclopiazonic acid production. Among them, one strain of *Penicillium cyclopium* was able to produce low level of ochratoxin A. Three strains of *Penicillium viridicatum* were found to produce cyclopiazonic acid at level as high as 12 mg/kg in vitro culture on YES medium. These results are in agreement with studies done in other countries and they show that uncontrolled fungal development has to be limited on cured meat products.

KEY-WORDS : *Penicillium*, fungal mycoflora, dry cured meat products, toxigenic potential, cyclopiazonic acid, ochratoxin A.

RÉSUMÉ

Potentiel toxigène des souches fongiques isolées des produits carnés séchés et affinés : étude préliminaire.

Le développement de moisissures en surface des produits carnés séchés et affinés participe directement à l'acquisition et à l'amélioration des qualités organoleptiques de ce type de produits. Toutefois, un développement incontrôlé d'une flore fongique contaminante peut être à l'origine d'une altération de l'aspect de ces produits voire conduire à la production et à l'accumulation de mycotoxines. Cette étude préliminaire a pour but de déterminer la nature de la flore fongique observée à la surface de produits carnés commercialisés en France et de tester le potentiel toxigène des souches isolées. Trente sept souches, appartenant à 12 espèces différentes de *Penicillium*, ont été identifiées. Dix huit de ces souches sont connues comme pouvant être capables de produire certaines mycotoxines. Nous avons donc testé leur capacité à produire de l'ochratoxine A, de la citrinine et de l'acide cyclopiazonique. Une de ces souches, appartenant à l'espèce *Penicillium cyclopium*, s'est révélée être productrice de faibles niveaux d'ochratoxine A. Trois autres isolats de *Penicillium viridicatum* ont produit de l'acide cyclopiazonique à des concentrations pouvant atteindre 12 mg/kg après culture sur du milieu YES. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans d'autres pays et ils montrent qu'il faut éviter tout développement fongique incontrôlé en surface des produits carnés affinés.

MOTS-CLÉS : flore fongique, *Penicillium*, produits carnés, potentiel toxigène, acide cyclopiazonique, ochratoxine A.

Introduction

The thin layer of moulds recovering cheeses and cured meat products (a) has an antioxydative effect and holds the colour, (b) allows the surface not to become sticky or slimy, (c) participates to the development of a characteristic flavour, due to decomposition of lipids and proteins, and (e) finally, it gives the product its typical appearance [6, 18, 23]. Usually, the fungal species used in this kind of food making are selected strains (i.e: *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*) [14]. They have been tested for toxigenic potential before any introduction in alimentary product [8, 12, 13]. Unfortunately, uncontrolled fungal development may also occur on these products. It may then lead to different detrimental effects: alterations of aspect, technological properties and nutritive value, development of mycosis and allergy agents, and production of mycotoxins [19]. These fungal

contaminants usually belong to the genus *Penicillium* and/or *Aspergillus* [1, 5]. In a recent study, we showed that casual contamination of cheese by *Penicillium citrinum* could lead to production and accumulation of citrinin in the product [2]. There are only few studies on the fungal mycoflora of cured meat products. They mainly concern Spanish, Austrian or German productions [15, 16, 17, 24, 28]. No study was done to determine fungal mycoflora of dry cured meat products commercialised in France and to explore toxigenic potential of fungal strains isolated from processed foods.

The aim of this study was to investigate fungal mycoflora on a few number of commercial dry cured meat products and to test the toxigenic potential of *Penicillium* isolated strains in order to determine if there is any hazard for consumers and if this topic should be further developed.

Material and methods

Solvents and reagents

All solvents and reagents were purchased from VWR international (Fontenay sous bois, France) and were analytical grade. Mycotoxins standards (citrinin, cyclopiazonic acid, and ochratoxin A) were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Citrinin was dissolved in chloroform, Ochratoxin A in 95° ethanol and Cyclopiazonic acid in methanol to obtain 1 mg/ml stock solutions that were stored at -20°C.

TLC plates were silica gel 60 plates (Merk, Nogent sur Marne, France). For citrinin quantification, plates were first dipped in 10% oxalic acid solution for 30 seconds and then air dried overnight before use.

Meat samples

Five dry cured hams were purchased from French commercial market. They were produced in southwest of France. They were chosen randomly among slightly mouldy ones.

Five ripened dry sausage were also tested. They were covered by a thin layer of mould and corresponded to usual aspect of such products.

Fungal count and identification

For dry cured ham: surfaces were totally scrapped with a sterile lancet and sample was suspended into 5% tween 80 solution. After dispersion and homogenisation, 1 ml of decimal dilutions was plated on both malt agar medium (2% agar, 2% malt, 50 ppm chloramphenicol) and salted malt agar medium (malt agar medium + 6% NaCl). Fungal colonies were counted after 3, 5 and 7 days of culture at 25 and 32°C. Results were expressed as CFU/cm² of meat.

For dry sausages, 25 cm² of surface were dispersed in 5% tween 80 solution and decimal dilutions were prepared and plated on the same media. Results were expressed as CFU/cm².

The different strains were isolated from plates by several planting out on Czapeck and malt agar media. Identification of fungal species was done according to Raper and Fennel [21] and Raper and Thom [22] by macroscopic and microscopic examination of isolated strains at 3, 5 and 7 days of culture.

Toxicogenic potential determination

Potentially toxicogenic strains were tested for ochratoxin A, citrinin and cyclopiazonic acid production after 15 days of culture (23°C) on Yeast Extract Sucrose medium (2% yeast extract, 16% sucrose). For cyclopiazonic acid production, strains were also incubated on sterile rice for the same time and at the same temperature.

Mycotoxin quantification

Toxins were extracted from both culture media by mechanical agitation in appropriate solvent. After filtration, extraction and concentration, the toxins were separated by thin layer chromatography. Mycotoxins were then quantified by spectrofluorodensitometry using a Shimadzu CS930 fluorodensitometer (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan).

Quantification was done by comparison with known amounts of standard spotted on the same plate. Briefly:

- Ochratoxin A was extracted by acetonitrile-4% KCl_{aq} (9-1), separated by migration in toluene- ethyl acetate-formic acid (5:4:1, vol/vol/vol) and quantified by fluorodensitometry at 333 nm [3]. Limit of quantification: 20 ng/g in the culture medium; limit of detection: 10 ng/g.

- Cyclopiazonic acid was quantified as already described by Landsen [11]. Briefly, culture medium was extracted by methanol-chloroform (1:1, vol/vol). After filtration, extracts were partitioned against chloroform and filtered on phase separator filters. Development system used was ethyl-acetate/isopropanol-ammoniac (20:15:10). After a drying step, cyclopiazonic acid was revealed on plates by spraying a 10% paradimethylaminobenzaldehyde solution. Quantification was done at 600 nm. Limit of quantification: 200 ng/g in the culture medium, limit of detection: 80 ng/g

- Citrinin was extracted by acetonitrile- KCl (4% in water) (9-1) acidified by H₂SO₄ to pH 3. Development system used was toluene/ethyl-acetate/formic acid (6:3:1, vol). Citrinin was then quantified by fluorimetric detection at 330 nm [22]. Limit of quantification: 20 ng/g in the culture medium, limit of detection: 10 ng/g.

Results and discussion

Fungal mycoflora of dry cured meat products

Typical macroscopic aspect of cured hams and sausages used in this study are shown in figure 1.



Figure 1: typical macroscopic aspect of cured hams and sausages purchased from french commercial market.

Sample	Fungal genus	Malt agar	Salted malt agar
H1	<i>Penicillium</i>	183	91
	<i>Aspergillus</i>	0	366
	Yeasts	640	1282
H2	<i>Penicillium</i>	482	413
	<i>Aspergillus</i>	0	0
	Yeasts	2275	2000
H3	<i>Penicillium</i>	0,2	0,1
	<i>Aspergillus</i>	0	0
	Yeasts	179	344
H4	<i>Penicillium</i>	7,5	8,9
	<i>Aspergillus</i>	0	0
	Yeasts	136	0
H5	<i>Penicillium</i>	625	1312
	<i>Aspergillus</i>	0	0
	Yeasts	625	375
S1	<i>Penicillium</i>	600	350
	<i>Aspergillus</i>	0	0
	Yeasts	40	40
S2	<i>Penicillium</i>	250	290
	<i>Aspergillus</i>	0	0
	Yeasts	0	20
S3	<i>Penicillium</i>	300	120
	<i>Aspergillus</i>	0	0
	Yeasts	6800	7000
S4	<i>Penicillium</i>	520	350
	<i>Aspergillus</i>	0	0
	Yeasts	0	0
S5	<i>Penicillium</i>	500	110
	<i>Aspergillus</i>	0	0
	Yeasts	7000	7000

Table I: fungal numerations obtained for dry cured hams on malt agar and salted malt agar medium. Results are expressed in $\times 10^3$ CFU/cm². H: cured ham, S: ripened sausage

Results of fungal numerations are reported on table I. As estimated by macroscopic aspect, fungal mycoflora of cured hams was less developed than that of ripened sausages. Fungal isolates easily grown on salted malt agar medium. This result means that they are mainly xerophilic species. It is consistent with the substrates that are characterized by reduced water activity (<0,9) and high NaCl concentration (>6%) [10]. The three cured hams presenting the higher contamination are those that have been ripened for the longest period. With one exception, all fungal isolates belong to *Penicillium* genus.

Thirty seven different strains belonging to 12 *Penicillium* species were identified (table II). *P. nalgiovensis* LAXA was the most represented one (30% of isolated strains) specially on sausages. This species, usually used as fungal starter in sausage processing, is not known to be toxigenic. Other non-toxigenic species such as *P. terrestre*, and *P. solitum* were isolated on hams only. Eighteen other isolated strains corresponding to *P. viridicatum* Westling, *P. palitans* Westling, *P. olivino-viride* Biourge, *P. cyclopium*, *P. expansum* Link, *P. crustosum*, *P. granulatum* and *P. steckii* are reported to be able to produce one or several mycotoxins such as patulin, ochratoxin A, citrinin or cyclopiazonic acid.

This mycoflora is consistent with those reported in the few articles describing *Penicillium* isolates to species level [17, 28]. These species are frequent contaminants of foods and feeds. Spores can be found in many environmental sources and conditions for ripening of dry-meat products (temperature, water activity and time) are very favourable to their

growth. Contrary to several studies done on Spanish products, we isolated only one strain of *Aspergillus*. This isolate was identified as *Aspergillus fischeri* Wehmer which is not known to have any toxigenic potential. Such a difference between French and Spanish products could be explained by differences in the climate of the production areas. In France, cured meat products are usually manufactured in cold mountain zones, unfavourable to *Aspergillus* development. Generally, French climate is not very favourable to the development of *Aspergillus* and it is now admitted that these species do not represent a real threat for human health in products that are completely processed in France [4].

Toxigenic potential determination

All potentially toxigenic isolates were tested for the production of cyclopiazonic acid, citrinin and ochratoxin A (table III). Patulin production was not tested since it has been demonstrated that this mycotoxin is not stable in meat products [12]. One strain of *P. cyclopium* isolated from ham was able to produce ochratoxin A at a low level. Three other *P. viridicatum* strains, isolated from three different samples of ripened sausages, were found to be able to produce cyclopiazonic acid at concentration as high as 12 mg/kg of culture medium. All these toxigenic strains were able to synthesise mycotoxins on YES medium and on autoclaved rice. Toxin levels were comparable in the two different media (data not shown). Although several studies already reported the toxigenic potential of fungal strains isolated from meat products, most of these studies focused on *Aspergillus* toxins such as aflatoxins and ochratoxins [9, 24, 25]. The production of

Fungal species	Serie	Possible toxins	Number of samples	
			S	H
<i>P. viridicatum</i> WESTLING	<i>viridicatum</i>	Cit., OTA, CA	4	0
<i>P. palitans</i> WESTLING	<i>viridicatum</i>	Cit, OTA, CA	0	1
<i>P. olivino-viride</i> BOURGE	<i>viridicatum</i>	Cit, OTA, CA	0	3
<i>P. cyclopium</i>	<i>cyclopium</i>	OTA, CA	0	2
<i>P. expansum</i> LINK	<i>expansum</i>	Cit, Patulin	1	5
<i>P. crustosum</i> THOM	<i>expansum</i>	CA	0	1
<i>P. granulatum</i> BAINIER	<i>granulatum</i>	Patulin	0	5
<i>P. terrestre</i> JENSEN	<i>terrestre</i>		0	1
<i>P. solitum</i> WESTLING	<i>terrestre</i>		0	1
<i>P. lanosum</i> WESTLING	<i>commune</i>	CA	0	1
<i>P. steckii</i> ZALESKI	<i>citrinum</i>	Cit	0	1
<i>P. nalgiovensis</i> LAXA			7	4
<i>A. fischeri</i> WEHMER	<i>fumigatus</i>		1	

Table II: Fungal species isolated from cured ham and ripened sausages. Indicated toxins are those reported to be potentially produced by this fungal species. S: ripened sausage; H: dry cured ham. Cit: citrinin, OTA: ochratoxin A, CA: Cyclopiazonic acid

Strain (number of tested isolates)	Citrinin	Ochratoxin A	Cyclopiazonic acid
<i>P. crustosum</i> (1)	ND	ND	ND
<i>P. steckii</i> (1)	ND	ND	ND
<i>P. lanosum</i> (1)	ND	ND	ND
<i>P. cyclopium</i> (2)	ND	ND, 260 µg/kg	ND
<i>P. expansum</i> (5)	ND	ND	ND
<i>P. viridicatum</i> (4)	ND	ND	ND, 3, 10, and 12 mg/kg

Table III: toxigenic potential of *Penicillium* isolates. Toxins were quantified after a 15 days culture period in optimal conditions for toxinogenesis. ND: not detectable.

ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* strains isolated from dry-cured meat products has been reported [9]. In our study, none of the *P. viridicatum* strains were able to produce Ochratoxin A even if this fungal species is known to be an important producer of this toxin in other substrates such as cereals [20]. By contrast, one strain of *P. cyclopium*, isolated from cured ham produced low level of Ochratoxin A. Taking into account the numerous (known and unknown) toxins in the *Penicillium* genus, some authors estimated the toxicity of extracts using biological tests [17, 28]. However, one recent study on toxigenic potential of *Penicillium* isolates found on Spanish fermented sausages reported production of cyclopiazonic acid by some of the *Penicillium* strains [15]. Citrinin production has also been reported, but none of our strains was able to produce this toxin [27].

Conclusion

On the whole, present results show that French processed cured meat products may be contaminated by potentially toxigenic *Penicillium* strains. The species observed in samples belong to species known to be frequent contaminants of meat products or correspond to fungal starters used in manufacturing. Among isolates, 4 of them were found to be able to produce cyclopiazonic acid at relatively high level. Although this result has to be confirmed by more extensive studies on a large number of samples, it suggests that uncontrolled fungal development should be limited to avoid mycotoxin contamination of dry cured meat products.

Acknowledgements

The authors would like to thank Marie-Rose Trumel for technical assistance and Joseph Le Bars for expert assistance and helpful discussion in the study of fungal contamination of meat products.

References

- ANDERSEN S.J.: Compositional changes in surface mycoflora during ripening of naturally fermented sausages. *J. Food Protect.*, 1995, **58**, 426-429.
- BAILLY J.D., QUERIN A., LE BARS-BAILLY S., BENARD G., et GUERRE P.: Citrinin production and stability in cheese. *J. Food Protect.*, 2002, **65**, 1317-1321.
- BOUDRA H., LE BARS P., et LE BARS J.: Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, **61**, 1156-1158.
- CASTEGNARO M., ET PFOHL-LEZKOWICZ A. Les aflatoxines. In Les mycotoxines dans l'alimentation: evaluation et gestion du risque. CSHPF, Tec et Doc., 1999, 199-248.
- DELESPAUL G., GUEGUEN M., et LENOIR J.: La flore fongique superficielle des fromages de Saint Nectaire et de Tomme de Savoie, son Évolution au cours de l'affinage. *Rev. Lait. Fr.*, 1973, **313**, 715-729.
- DESMAZEAUD M.J., GRIPON J.C., LE BARS D., BERGERE J.L.: Etude du role des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. *Lait*, 1976, **56**, 379-396.
- EL-KADY I., EL-MARAGHY S., et ZOHRI A.N.: Mycotoxin producing potential of some isolates of *Aspergillus flavus* and *Eurotium* groups from meat products. *Microbiol. Res.*, 1994, **149**, 297-307.
- ENGEL G., et TEUBER M.: Toxic metabolites from fungal cheese starter cultures (*Penicillium camemberti* and *P. roqueforti*). In Mycotoxins in dairy products, VAN EGMOND (H.P.), Elsevier Appl. Sci., London and N.Y., 1989, 163-192.
- ESCHER F.E., KOEHLER P.E., ET AYRES J.C.: Production of ochratoxins A and B on country cured ham. *Applied microbiol.*, 1973, **26**, 27-30.
- HERNANDEZ E., et HUERTA T.: evolucion de los parametros

- microbiológicos del jamon curado. *Microbiologia*, 1993, 9, 10-19.
- 11.- LANDSEN J.A.: Determination of cyclopiazonic acid in peanuts and corn by thin layer chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1986, 69, 964-966.
 - 12.- LE BARS J., et LE BARS P.: Strategy for safe use of fungi and fungal derivatives in food processing. *Rev. Med. Vet.*, 1998, 149, 493-500.
 - 13.- LE BARS J.: Cyclopiazonic acid production by *Penicillium camemberti* Thom and natural occurrence of this mycotoxin in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1979, 38, 1052-1055.
 - 14.- LEISTNER L.: Mould-fermented foods: recent developments. *Food Biotechnol.*, 1990, 4, 433-441.
 - 15.- LOPEZ-DIAZ T.M., SANTOS J.A., GARCIA-LOPEZ M.L., et OTERO A.: Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenicity of *Penicillium isolates*. *Int. J. Food Microbiol.*, 2001, 68, 69-74.
 - 16.- MIZAKOVA A., PIPOVA M., et TUREK P.: The occurrence of moulds in fermented raw meat products. *Czech J. Food Sci*, 2002, 20, 89-94.
 - 17.- NUNEZ F., RODRIGUEZ M.M., BERMUDEZ M.E., et ASENSIO M.A.: Composition and toxigenic potential of the mould population on dry cured Iberian ham. *Food Microbiol.*, 1996, 32, 185-187.
 - 18.- PHILIPP S., et PEDERSEN P.D.: Mould cultures for the food industry. *Dan. Dairy Food Ind.*, 1988, 6, 10-12.
 - 19.- PITT J.I., et HOCKING A.D.: Fungi and food spoilage, 1985, Academic press, New York.
 - 20.- POHLAND A.E., NESHEIM S., et FRIEDMAN L.: Ochratoxin A: a review. *Pure Appl. Chem.*, 1992, 64, 1029-1046.
 - 21.- RAPER K.B., et FENNEL D.I.: *The genus Aspergillus*. The Williams & Wilkins Compagny, Baltimore. 1965.
 - 22.- RAPER K.B., et THOM C.: A manual of the *Penicillia*. Hafner Publishing Compagny, New York and London. 1968.
 - 23.- RODRIGUEZ M., NUNEZ F., CORDOBA J.J., BERMUDEZ M.E., et ASENSIO M.A.: evaluation of proteolytic activity of micro-organisms isolated from dry cured ham. *J Appl. Microbiol.*, 1998, 85, 905-912.
 - 24.- ROJAS F.J., JODRAL M., GOSALVEZ F., et POZO R.: Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish dry-cured ham. *Int. J. Food Microbiol.*, 1991, 13, 249-256.
 - 25.- STRZELECKI E., LILLARD H.S., et AYRES J.C.: Country cured ham as a possible source of aflatoxin. *Applied Microbiol.*, 1969, 18, 938-939.
 - 26.- TRAN T.S., BAILLY J.D., QUERIN A., LE BARS P., et GUERRE P.: Fungal contamination of rice from south Vietnam, mycotoxinogenesis of selected strains and residues in rice. *Rev. Med. Vet.*, 2001, 152, 555-560.
 - 27.- WU M.T., AYRES J.C., et KOEHLER P.E.: Production of citrinin by *Penicillium viridicatum* on country-cured ham. *Applied Microbiol.*, 1974, 27, 427-428.
 - 28.- WU M.T., AYRES J.C., et KOEHLER P.E.: Toxigenic *Aspergilli* and *Penicillia* isolated from aged cured meats. *Applied Microbiol.*, 1974, 28, 1094-1096.

Discussion

L'analyse de la flore fongique de produits de salaison sèche commercialisés en France a permis de mettre en évidence la présence de nombreuses espèces fongiques différentes, appartenant exclusivement au genre *Penicillium*.

Les isolats appartiennent à 12 espèces différentes de *Penicillium*, l'espèce prépondérante étant *P. nalgiovensis*. Il s'agit d'une espèce couramment utilisée en salaisonnerie comme « starter », notamment pour l'affinage des saucisses et saucissons secs. Cette flore est comparable celle décrite dans les rares travaux ayant poussé l'identification des *Penicillium* jusqu'à la détermination des espèces.

L'analyse de la flore fongique a montré que, parmi les espèces de *Penicillium* présentes, un certain nombre sont connues comme étant potentiellement toxigènes. Par exemple, *P. viridicatum*, *P. cyclopium*, *P. expansum*, *P. granulatum* sont des espèces connues pour être potentiellement productrices de certaines mycotoxines comme la patuline, l'ochratoxine A, la citrinine ou l'acide cyclopiazonique (Skrinjar *et al.*, 1992 ; Escoula, 1992 ; Kokkonen *et al.*, 2005 ; Morales *et al.*, 2007).

Par contre, notre étude n'a permis d'isoler qu'une seule espèce non représentative d'*Aspergillus* (*A. fischeri*), et ce, contrairement à ceux qui ont été rapportés dans les études réalisées sur les produits commercialisés en Espagne (Rojas *et al.*, 1991 ; Nunez *et al.*, 1996). Ces différences peuvent probablement s'expliquer par les conditions de production et d'affinage de ce type de produits dans ces deux pays. En effet, en France, les produits secs sont souvent affinés dans des zones montagneuses assez froides qui sont défavorables au développement des *Aspergillus*.

La détermination du potentiel toxigène de l'ensemble des isolats appartenant à des espèces connues pour produire des mycotoxines a montré que certaines de ces souches étaient capables de synthétiser des molécules toxiques après croissance sur milieu de culture. Ainsi, nous avons pu identifier une souche productrice de faibles de niveau d'ochratoxine A et trois souches capables de synthétiser de l'acide cyclopiazonique à des niveaux de plusieurs mg/kg. Ce dernier résultat vient confirmer une étude réalisée sur des saucisses sèches et qui avait montré la production d'acide cyclopiazonique par certains isolats de *Penicillium* (Lopez-Diaz *et al.*, 2001).

Néanmoins, la présence de moisissures toxigènes sur les produits de salaison sèche ne signifie pas forcément que ces souches soient capables de synthétiser ces composés toxiques sur ces substrats particuliers, dans les conditions normales de production. Aussi, nous nous

sommes ensuite attachés à étudier la production et la stabilité de certaines mycotoxines sur le jambon sec.

Article 4

**Production et stabilité de la patuline, l'ochratoxine A, la citrinine
et l'acide cyclopiazonique sur le jambon sec**

Introduction

Nos travaux précédents et plusieurs études antérieures ont démontré la présence possible de souches fongiques potentiellement toxigènes sur les produits de salaison sèche.

Ces souches sont capables de produire des aflatoxines (El Kady *et al.*, 1994 ; Rojas *et al.*, 1991), de la patuline (Mintzlaff *et al.*, 1972), de l'ochratoxine A (Escher *et al.*, 1973), de la citrinine (Andersen, 1995 ; Ciegler *et al.*, 1997), ou de l'acide cyclopiazonique (Lopez-Diaz *et al.*, 2001 ; Tabuc *et al.*, 2004) après culture *in vitro*. Par ailleurs, certains auteurs rapportent la présence d'aflatoxine B1 et d'ochratoxine A dans des produits carnés affinés (Jimenez *et al.*, 2001 ; Chiavaro *et al.*, 2002 ; Refai *et al.*, 2003) et la consommation de ces produits est suspectée d'être impliquée dans l'exposition alimentaire des consommateurs (Kuiper-Goodman, 1991 ; Ruprich *et al.*, 1993 ; Skaug *et al.*, 2001 ; Thuvander *et al.*, 2001).

Cependant, bien qu'il soit très clairement établi que la production de mycotoxine est directement dépendante de la nature du substrat sur lequel les souches fongiques se développent (Kokkonen *et al.*, 2005) seules quelques études ont cherché à évaluer le potentiel toxigène de souches fongiques directement sur un substrat carné (Bullerman *et al.*, 1969 ; Escher *et al.*, 1973, Wu *et al.*, 1974).

Par ailleurs, la contamination mycotoxique d'un aliment peut être considérée comme le résultat de l'équilibre qui s'établit entre la production et la dégradation naturelle de ces composés. Par conséquent, l'analyse de la stabilité des mycotoxines dans les produits de salaison sèche est importante car il s'agit d'aliments susceptibles d'être conservés longtemps sans précaution particulière.

L'objectif de ce travail a donc été de caractériser la production et la stabilité de la patuline, l'ochratoxine A, la citrinine et l'acide cyclopiazonique sur le jambon sec.

Research Note

Production and Stability of Patulin, Ochratoxin A, Citrinin, and Cyclopiazonic Acid on Dry Cured Ham

J. D. BAILLY,* C. TABUC, A. QUÉRIN, AND P. GUERRE

Mycotoxicology Research Unit, National Veterinary School, 23 Chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex, France

MS 04-498: Received 29 October 2004/Accepted 6 March 2005

ABSTRACT

Toxinogenic fungal species can be isolated from dry cured meat products, raising the problem of the direct contamination of these foods by mycotoxins known to be carcinogenic or potent carcinogens. Because the contamination of a food by mycotoxins can be considered a balance between production and degradation, the stability of mycotoxins on dry cured meat was also investigated. This study focused on patulin, ochratoxin A, citrinin, and cyclopiazonic acid that can be produced by fungal species previously isolated from dry cured meat products sold on the French market. We demonstrated that neither patulin nor ochratoxin A were produced on dry meat by toxigenic strains, whereas relatively high amounts of citrinin and cyclopiazonic acid were found after a 16-day incubation period at 20°C (87 and 50 mg/kg, respectively). After direct contamination, the initial content of patulin rapidly decreased to become undetectable after only 6 h of incubation at 20°C. For both citrinin and ochratoxin A, the kinetics of decrease at 20°C was less rapid, and the two toxins presented half-lives of 6 and 120 h, respectively. By contrast, more than 80% of the initial contamination in cyclopiazonic acid was still found on ham after a 192-h incubation period. Toxin stability was not affected by storage at 4°C. These results suggest that growth of toxigenic strains of *Penicillium* has to be avoided on dry meat products.

Several studies have shown that mold species belonging to the genus *Penicillium* and *Aspergillus* could be isolated from cured meat products such as ripened sausages or dry cured ham (1, 24). Interestingly, some of these strains are able to produce aflatoxins (11, 35), patulin (28), ochratoxins (12), citrinin (1, 10), or cyclopiazonic acid (27, 41) on culture medium. Also, aflatoxin B1 (34) and ochratoxin A (8, 18) have been isolated from cured meat products, and the consumption of these products has been suspected to play a role in human exposure to mycotoxins (19, 36, 38, 42). However, although the toxigenic potential of molds is greatly linked to the substrate on which these molds grow, there are only a few studies designed to test the toxigenic potential of *Penicillium* or *Aspergillus* on cured meat products (7, 12, 44). Indeed, most of the studies demonstrating the toxigenic potential of molds isolated from dry cured meat were conducted on culture medium (27, 30, 45).

On the other hand, the occurrence of mycotoxins in food can be considered a balance between production and degradation. Therefore, investigation into the stability of mycotoxins on dry cured meat is of great interest because these foods can be stored for long periods without particular care. Unfortunately, no data concerning the stability of aflatoxins, patulin, ochratoxin A, citrinin, or cyclopiazonic acid were available on cured meat, whereas many studies were conducted to determine mycotoxin stability during

food processing on numerous foods, including cheese (4, 13, 26, 32, 40).

The aim of this work was to study the production of patulin, ochratoxin A, citrinin, and cyclopiazonic acid on dry cured meat product. The stability of these toxins at different temperatures of storage was also investigated. Patulin, ochratoxin A, citrinin, and cyclopiazonic acid were selected because they can be produced by fungal species previously isolated from dry cured meat products sold on the French market.

MATERIALS AND METHODS

Solvents and reagents. All solvents and reagents were purchased from VWR International (Fontenay sous bois, France) and were of analytical grade. Mycotoxin standards (patulin, citrinin, cyclopiazonic acid, and ochratoxin A) were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). Patulin was dissolved in ethyl acetate, ochratoxin A in 95° ethanol, citrinin in chloroform, and cyclopiazonic acid in methanol to obtain 1 mg/ml stock solutions that were stored at -20°C.

Fungal growth and mycotoxin production. Fungal strains *Penicillium patulum*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium citrinum*, and *Penicillium viridicatum* produced patulin, ochratoxin A (OTA), citrinin, and cyclopiazonic acid (CPA), respectively. The strain of *P. patulum* was a generous gift from Dr. O. Puel (INRA, Pharmacology and Toxicology Unit, Toulouse, France), and *P. citrinum* was purchased at the Agricultural Research Service Culture Collection (Peoria, Ill.) and identified as NRRL 1841. The two other strains belong to our strain collection. They were isolated from dry cured meat or Vietnamese rice, and their toxigenic potential has already been characterized (41, 43).

* Author for correspondence. Tel: +33 561 193 229; Fax: +33 561 491 263; E-mail: jd.bailly@envt.fr.

Strains were grown on malt agar medium (2% malt, 2% agar) supplemented with chloramphenicol (50 mg/liter) for 7 days at 20°C. From these fungal cultures, spore suspensions were prepared by the addition of 9 ml of Tween 80 (0.05%) to the petri dishes. Quantification of the number (CFU/ml) of these suspensions was then determined by the Petrifilm system as recommended by the manufacturer (3M, Malakoff, France). Spore suspension concentration was then adjusted to 10⁶ CFU/ml.

Dry cured ham, produced in Spain or southwest France, was purchased in the French commercial market. Ten-gram pieces (5 by 5 by 0.5 cm) were placed in small incubation chambers (200 ml) containing 30 ml water at the bottom to avoid further drying of the meat. Meat pieces were not in direct contact with water. After this storage procedure, both aspect and odor of controls remained unchanged. Fungal contamination was done by incubating 100 µl of a 10⁶ CFU/ml spore suspension on cured meat or yeast extract medium (YES; 2% yeast extract, 16% sucrose, Oxoid, Dardilly, France) several times at 20 and 4°C. All experiments were done three times, each in triplicate.

Mycotoxin stability. The stability of patulin, ochratoxin A, citrinin, and cyclopiazonic acid on dry cured meat samples was tested by direct contamination with 100 µl of a solution containing 50 µg of pure mycotoxin. Patulin was dissolved in ethyl acetate, OTA in ethanol, citrinin in chloroform, and CPA in methanol. Contaminated cured ham samples were then incubated several times at both 20 and 4°C in incubation chambers.

Mycotoxin quantification. Toxins were extracted from both culture media and meat samples by mechanical agitation and filtration through Whatman no. 1 filters. The toxins were separated by thin layer chromatography on silica gel 60 TLC plates (Merck, Nogent sur Marne, France). Mycotoxins were then quantified by fluorodensitometry with a Shimadzu CS930 fluorodensitometer (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). Quantification was by comparison with known amounts of standard spotted on the same plate. Briefly:

(i) Patulin was extracted by ethyl acetate, separated by migration in toluene–ethyl acetate–formic acid (5/4/1, vol/vol/vol). Plates were revealed by spraying methylbenzothiazolinehydrazine 0.5% and heating 10 min at 130°C (5). The yellow spot of patulin was quantified at 430 nm. The limit of quantification was 100 µg/kg, and recovery of the method was 85%.

(ii) Ochratoxin A was extracted by acetonitrile–4% KCl_{aq} (9/1, vol/vol), separated by migration in toluene–ethyl acetate–formic acid (5/4/1, vol/vol/vol), and quantified by fluorimetry at 333 nm (6). The limit of quantification was 20 µg/kg, and recovery of the method was 85%.

(iii) Citrinin was extracted by acetonitrile–4% KCl_{aq} (9/1, vol/vol) and acidified by H₂SO₄ to pH 3. The development system was toluene–ethyl acetate–formic acid (6/3/1, vol/vol/vol). Citrinin was then quantified by fluorimetric detection at 330 nm (4). The limit of quantification was 20 µg/kg, and recovery of the method was 95%.

(iv) Cyclopiazonic acid was quantified as already described by Landsen (20). Culture medium was extracted by methanol–chloroform (1/1, vol/vol). After filtration, extracts were partitioned against chloroform and filtered on phase separator filters. The development system was ethyl acetate–isopropanol–ammoniac (20/15/10, vol/vol/vol). After a drying step, cyclopiazonic acid was revealed on plates by spraying Ehrlich reagent. Quantification was at 600 nm. The limit of quantification was 200 µg/kg, and recovery of the method was 94%.

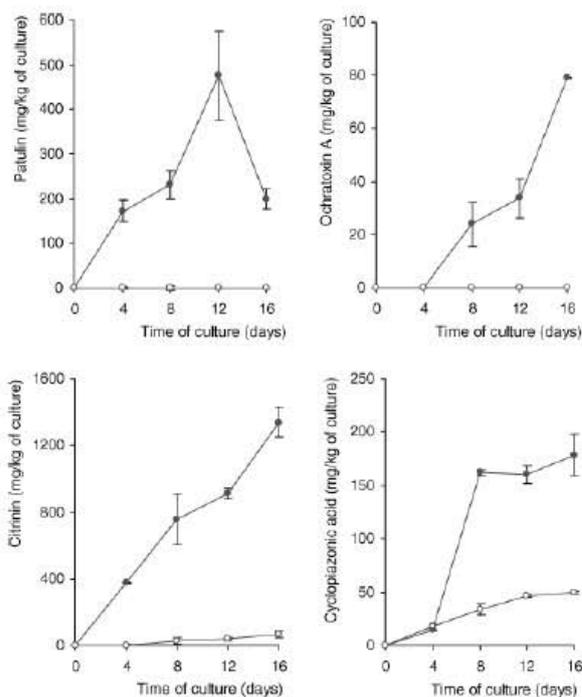


FIGURE 1. Production of patulin, ochratoxin A, citrinin, and cyclopiazonic acid on YES medium (light symbols) and on dry cured ham slices (bold symbols) at 20°C. Results are presented as the mean of three distinct experiments, each done in triplicate.

RESULTS

Mycotoxin production. The toxigenic potential of selected mold strains was evaluated on both dry cured ham and YES. The results obtained in the different tested conditions are reported in Figure 1. Neither patulin nor ochratoxin A production was found on dry cured ham slices, whatever the incubation time tested. Nevertheless, after a 16-day incubation period, the strains of *P. patulum* and *A. ochraceus* used in this study were able to produce toxins on YES medium at about 475 and 79 mg/kg for patulin and ochratoxin A, respectively. Citrinin production by *P. citrinum* was rapidly observed after only 2 days of incubation at 20°C on YES medium and 4 days on meat samples. Levels as high as 86.9 mg/kg were obtained after 16 days of culture on dry cured ham, whereas the mycotoxin level reached 1,330 mg/kg on YES medium. Cyclopiazonic acid production was also observed after contamination of dry cured ham by toxigenic *P. viridicatum* spore suspension. Kinetics of production was comparable to that observed for citrinin, and about 50 mg/kg was obtained on dry cured ham after 16 days. About 180 mg/kg was obtained on YES medium. For the four tested toxins, no production was observed when meat slices or YES medium were incubated at 4°C (data not shown), even if a mild mycelium development could be observed after 10 days of incubation.

Stability of mycotoxins. The stability of pure mycotoxins added to meat slices of dry cured meat was tested at both 20 and 4°C (Fig. 2). At 20°C, the initial content of

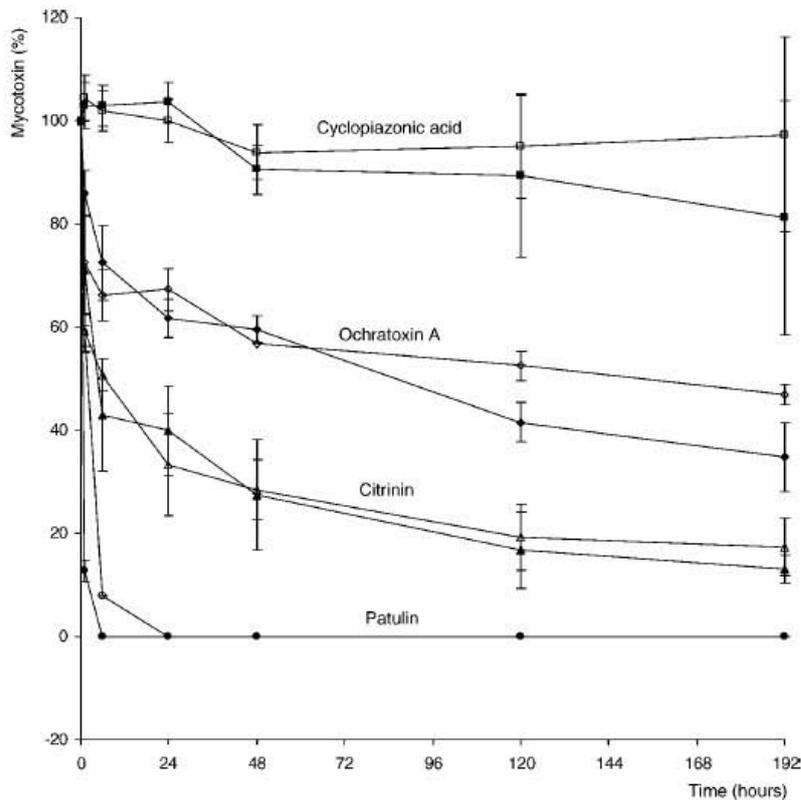


FIGURE 2. Stability of patulin, ochratoxin A, citrinin, and cyclopiazonic acid at 20°C (bold symbols) and 4°C (light symbols) after contamination of dry cured ham slices with 50 µg of pure mycotoxins. Results are presented as the mean of three distinct experiments, each done in triplicate.

patulin decreased rapidly because 90% is lost after only 1 h of incubation. Patulin level became undetectable after 6 h of incubation. For citrinin, more than 50% of the initial content was lost after only 6 h of incubation at 20°C. Less than 15% of the toxin remained after 192 h of incubation. Kinetics of disappearance of OTA was slightly different because the half-life of the toxin was about 120 h, and about 30% of the initial contamination was still present after a 192-h incubation period at 20°C. By contrast, more than 80% of the initial content of CPA was still observed after 192 h of storage at 20°C. As shown in Figure 2, stability of the toxins was not strongly affected by storage at 4°C.

DISCUSSION

Several studies have shown that cured meat products can be contaminated by fungal species belonging to the genus *Aspergillus* and *Penicillium* (1, 11, 27, 28, 30, 35, 45). Because some of these species are known to be toxigenic, they can contaminate this kind of product by compounds that have been identified as carcinogenic (Aflatoxin B1), potent carcinogenic (OTA and citrinin), or mutagenic (CPA) (2, 9, 14–17, 39). Recently, we showed that ripened cured meat products commercially sold in France could be contaminated by toxigenic *Penicillium* strains but not by *Aspergillus* species, some isolates producing patulin, OTA, citrinin, and CPA (40, 41). By contrast, only a few studies have demonstrated the presence of mycotoxins in cured meat products (8, 18, 34). This can be linked to the lack

of production of mycotoxins on this kind of substrate, to the rapid degradation of the toxins, or to both. That is why we studied both production and stability of different mycotoxins on dry cured ham.

In this study, the strain of *P. patulum* used was unable to produce any detectable amount of patulin in dry meat, whereas it produced around 475 mg/kg of this mycotoxin in YES culture medium. This result confirms that the toxigenic potential of molds is directly dependent on the substrate on which they are grown (22, 29, 30), in agreement with previous studies done on other substrates such as cheese (40), and can be explained by the high protein content of these kinds of foods. Indeed, it is now well demonstrated that the ability of patulin to bind with SH compounds leads to rapid disappearance of the toxin (25). Because the mycotoxin cannot be recovered from these adducts (25), the contamination of meat products by patulin can be considered of little importance to consumer health.

In the same way, the *A. ochraceus* strain used was unable to produce detectable amounts of OTA on dry cured ham, whereas it produced 79 mg/kg of the toxin when cultured on YES medium. This result is in agreement with a previous study that found a highly toxigenic strain of *A. ochraceus* that produced only 0.4 to 6 mg/kg of OTA after 21 days of incubation on ham, whereas it was able to produce 151 mg/kg on rice culture (12). These different results obtained on ham and rice or YES medium can be explained by the low toxigenic potential of *Aspergillus* on this kind of substrate, the rapid degradation of the toxin, or both.

Here, we demonstrated that the half-life of OTA is about 120 h. This last result suggests that OTA might be converted into another molecule on dry cured ham. The toxicological signification of this conversion has to be elucidated.

By contrast, the toxigenic *Penicillium* strain was able to produce citrinin on dry cured ham. About 73 mg/kg have been observed after 16 days of incubation. Previous studies showed that citrinin-producing strains could be isolated from ripened meat products and cheeses (44, 45). However, no data are available concerning citrinin content in meat products, despite this toxin's suspected role in Balkan endemic nephropathy (31) and its mutagenicity (37). The study of the stability of citrinin at 20 and 4°C demonstrates that the half-life of the toxin is about 6 h, suggesting that citrinin is only partially stable on dry cured ham. This result agrees with those obtained on some cheeses and cereals (4, 13).

Two recent studies showed that *Penicillium* strains isolated from dry meat products could produce cyclopiiazonic acid in culture medium (27, 41), but no survey is available on the contamination of dry cured meat products by CPA, despite its suspected role in "kodua poisoning" in humans (2, 33) and its mutagenicity on *Salmonella typhi* assay. In this study, we demonstrated that the toxigenic strain of *P. viridicatum* used is able to produce cyclopiiazonic acid on dry cured meat. We also demonstrated that cyclopiiazonic acid is stable on dry meat products because more than 80% of the initial contamination is still recoverable after 8 days of incubation. Taken together, these results suggest that an accumulation of a relatively high level of CPA can be observed after contamination of dry cured meat. They suggest that fungal strains used in cured meat processing should be tested for their ability to produce CPA before use on commercial products. This recommendation is in agreement with a previous one concerning the use of fungal starters in cheese (21, 23).

This study shows that strains of *P. citrinum* and *P. viridicatum* can produce citrinin and cyclopiiazonic acid, respectively, on dry cured meat products at relatively high levels. Some of these toxins, such as CPA, are quite stable on such a substrate, whereas others, such as patulin, rapidly disappear. The stability of citrinin and OTA can be considered as intermediate. Taken together, these results suggest that growth of toxigenic strains of *Penicillium* has to be avoided on dry meat products. This objective could be achieved by regular controls of fungal mycoflora that develop during the ripening period.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Sylviane Bailly and Pierrette Le Bars for helpful advice on mycological aspects and Mrs. Marie-Rose Trumel for technical assistance.

REFERENCES

- Andersen, S. J. 1995. Compositional changes in surface mycoflora during ripening of naturally fermented sausages. *J. Food Prot.* 58: 426-429.
- Anthony, M., K. K. Janardhanan, and Y. Shukla. 2003. Potential risk of acute hepatotoxicity of kodo poisoning due to exposure to cyclopiiazonic acid. *J. Ethnopharmacol.* 87:211-214.
- Arai, M., and T. Hibino. 1983. Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats. *Cancer Lett.* 17:281-287.
- Bailly, J. D., A. Querin, S. Le Bars-Bailly, G. Benard, and P. Guerre. 2002. Citrinin production and stability in cheese. *J. Food Prot.* 65: 1317-1321.
- Betina, V. 1985. Thin layer chromatography of mycotoxins. *J. Chromatogr.* 334:211-276.
- Boudra, H., P. Le Bars, and J. Le Bars. 1995. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1156-1158.
- Bullerman, L. B., P. A. Hartman, and J. C. Ayres. 1969. Aflatoxin production in meats: aged dry salamis and aged country cured hams. *Appl. Microbiol.* 18:718-722.
- Chiavaro, E., A. Lepiani, F. Colla, P. Bettoni, E. Pari, and E. Spotti. 2002. Ochratoxin A determination in ham by immunaffinity clean up and a quick fluorometric method. *Food Add. Contam.* 19:575-581.
- Chu, F. S. 1991. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. *Mutation Res.* 259: 291-306.
- Ciegler, A., R. F. Vesonder, and L. K. Jackson. 1997. Production and biological activity of patulin and citrinin from *Penicillium expansum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:1004-1006.
- El Kady, I., S. El Maraghy, and A. N. Zohri. 1994. Mycotoxin producing potential of some isolates of *Aspergillus flavus* and *Eurotium* groups from meat products. *Microbiol. Res.* 149:297-307.
- Escher, F. E., P. E. Koehler, and J. C. Ayres. 1973. Production of ochratoxins A and B on country cured ham. *Appl. Microbiol.* 26: 27-30.
- Harwig, J., B. J. Blanchfield, and G. Jarvis. 1977. Effect of water activity on disappearance of patulin and citrinin from grain. *J. Food Sci.* 42:1225-1228.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1986. Citrinin, vol. 40. IARC, Lyon, France.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1993. Ochratoxin A, vol. 56. IARC, Lyon, France.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 2002. Aflatoxins, vol. 82. IARC, Lyon, France.
- Jeswel, P. 1995. Cumulative effect of ochratoxin A and citrinin on induction of hepatorenal carcinogenesis in mice (*Mus musculus*). *Biochem. Lett.* 52:269-275.
- Jimenez, A. M., A. Lopez-de-Cerain, E. Gonzales-Penas, J. Bello, and A. L. de-Cerain. 2001. Determination of ochratoxin A in pig derived pates by high performance liquid chromatography. *Food Add. Contam.* 18:559-563.
- Kuiper-Goodman, T. 1991. Risk assessment to humans of mycotoxin in animal-derived food products. *Vet. Hum. Toxicol.* 33:325-332.
- Landen, J. A. 1986. Determination of cyclopiiazonic acid in peanuts and corn by thin layer chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69:964-966.
- Le Bars, J. 1979. Cyclopiiazonic acid production by *Penicillium camemberti* Thom and natural occurrence of this mycotoxin in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:1052-1055.
- Le Bars, J. 1982. Toxinogénèse en fonction des conditions écologiques du système grain/microorganisme, p. 376-393. In J. L. Mul-ton (ed.), Conservation et stockage des grains et graines et produits derives, vol. 1. Tech et Doc., Lavoisier, Paris.
- Le Bars, J., and P. Le Bars. 1998. Strategy for safe use of fungi and fungal derivatives in food processing. *Rev. Med. Vet.* 149:493-500.
- Leistner, L. 1990. Mould-fermented foods: recent developments. *Food Biotechnol.* 4:433-441.
- Lieu, F. Y., and L. B. Bullerman. 1978. Binding of patulin and penicillic acid to glutathione and cysteine and toxicity of the resulting adducts. *Milchwissenschaft* 33:16-20.
- Lopez-de-Cerain, A., E. Gonzales-Penas, A. Jimenez, J. Bello, and A. L. de Cerain. 2002. Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. *Food Add. Contam.* 19:1058-1064.
- Lopez-Diaz, T. M., J. A. Santos, M. L. Garcia-Lopez, and A. Otero.

2001. Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenicity of *Penicillium* isolates. *Int. J. Food Microbiol.* 68: 69–74.
28. Mintzlaff, H. J., A. Ciegler, and L. Leistner. 1972. Pathogenic and toxinogenic yeasts and mould fungi in meat and meat products. *Arch. Lebensmittelhyg.* 23:287–291.
29. Nunez, F., M. C. Diaz, M. Rodriguez, E. Aranda, A. Martin, and M. A. Asensio. 2000. Effect of substrate, water activity, and temperature on growth and verrucosin production by *Penicillium polonicum* isolated from dry cured meat. *J. Food Prot.* 63:231–236.
30. Nunez, F., M. M. Rodriguez, M. E. Bermudez, J. J. Cordoba, and M. A. Asensio. 1996. Composition and toxigenic potential of the mould population on dry cured Iberian ham. *Int. J. Food Microbiol.* 32:185–197.
31. Pfohl-Leszkowicz, A., T. Petkova-Bocharova, I. N. Chernozemsky, and M. Castegnaro. 2002. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Add. Contam.* 19:282–302.
32. Prasongsidh, B. C., K. Kailasapathy, G. R. Skurray, and W. L. Bryden. 1997. Stability of cyclopiazonic acid during storage and processing of milk. *Food Res. Int.* 30:793–798.
33. Rao, L. B., and A. Husain. 1985. Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet causing “kodua poisoning” in man and its production by associated fungi. *Mycopathologia* 89:177–180.
34. Refai, M. K., Z. M. Niazi, N. H. Aziz, and N. E. Khafaga. 2003. Incidence of aflatoxin B1 in the Egyptian cured meat basterma and control by gamma-irradiation. *Nahrung* 47:377–382.
35. Rojas, F. J., M. Jodral, F. Gosalvez, and R. Pozo. 1991. Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish dry-cured ham. *Int. J. Food Microbiol.* 13:249–256.
36. Ruprich, J., and V. Ostry. 1993. Study of human exposure to ochratoxin A and assessment of possible sources. *Cent. Eur. J. Public Health* 1:46–48.
37. Sabater-Vilar, M., R. F. M. Maas, and J. Fink-Gremmels. 1999. Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. *Mutation Res.* 444:7–16.
38. Skaug, M. A., I. Helland, K. Solvoll, and O. D. Saugstad. 2001. Presence of ochratoxin A in human milk in relation to dietary intake. *Food Add. Contam.* 18:321–327.
39. Sorenson, W. G., J. D. Tucker, and J. P. Simpson. 1984. Mutagenicity of the tetramic mycotoxin cyclopiazonic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:1355–1357.
40. Stott, W. T., and L. B. Bullerman. 1978. Instability of patulin in cheddar cheese. *J. Food Sci.* 41:201–203.
41. Tabuc, C., J. D. Bailly, S. Bailly, A. Querin, and P. Guerre. 2004. Toxigenic potential of fungal mycoflora isolated from dry cured meat products: preliminary study. *Rev. Med. Vet.* 156:287–291.
42. Thuvander, A., J. E. Paulsen, K. Axberg, N. Johansson, A. Vidnes, H. Enghardt-Barbieri, K. Trygg, K. Lund-Larsen, S. Jahrl, A. Widenfalk, V. Bosnes, J. Alexander, K. Hult, and M. Olsen. 2001. Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. *Food Chem. Toxicol.* 39:1145–1151.
43. Tran, T. S., J. D. Bailly, A. Querin, P. Le Bars, and P. Guerre. 2001. Fungal contamination of rice from south Vietnam, mycotoxinogenesis of selected strains and residues in rice. *Rev. Med. Vet.* 152: 555–560.
44. Wu, M. T., J. C. Ayres, and P. E. Koehler. 1974. Production of citrinin by *Penicillium viridicatum* on country cured ham. *Appl. Microbiol.* 27:427–428.
45. Wu, M. T., J. C. Ayres, and P. E. Koehler. 1974. Toxigenic *Aspergilli* and *Penicillia* isolated from aged cured meat. *Appl. Microbiol.* 28: 1094–1096.

Discussion

Dans cette étude, nous avons montré que la souche utilisée de *Penicillium patulum* n'était pas capable de produire de la patuline sur le jambon sec alors qu'elle en produit 475 mg/kg après culture sur milieu YES liquide. Ceci confirme l'influence directe du substrat sur la toxinogénèse, comme cela a déjà été clairement démontré (Le Bars, 1982 ; Nunez *et al.*, 2000). Cette absence de synthèse peut s'expliquer par la forte teneur en protéine de ce type de substrat. En effet, la faculté de la patuline à se lier aux groupements sulhydryl entraîne une disparition analytique rapide de la molécule (Lieu et Bullerman, 1978).

De la même façon, la souche utilisée d'*Aspergillus ochraceus* n'a pas produit de niveau détectable d'OTA sur le jambon. Ce résultat peut être lié à l'absence de production de la molécule sur ce substrat ou bien à une dégradation rapide de la toxine formée. Dans notre étude, l'OTA présente une demi-vie de 120h sur le jambon sec, ce qui suggère que cette toxine puisse être dégradée ou convertie en une autre molécule sur ce type de substrat, sans que nous soyons à même de préciser la signification toxicologique de ce type de conversion.

Par comparaison, les souches fongiques utilisées dans l'étude ont été capables de produire de la citrinine et de l'acide cyclopiazonique sur le substrat jambon sec.

En ce qui concerne la citrinine, aucune donnée n'est disponible sur la possible présence de cette mycotoxine dans les produits carnés, et ce malgré son implication suspectée dans la néphropathie endémique des balkans (Pfohl-Leskowicz *et al.*, 2002). Toutefois, les études de stabilité réalisées à 20 et 4°C montrent que cette molécule n'est que partiellement stable dans ce substrat avec une demi-vie de l'ordre de 6h. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur d'autres substrats comme le fromage ou les céréales (Bailly *et al.*, 2002 ; Harwig *et al.*, 1977).

Notre étude sur la flore fongique des produits de salaison sèche ainsi qu'une étude espagnole (Lopez-Diaz *et al.*, 2001) a montré la présence de souche de *Penicillium* productrice d'acide cyclopiazonique sur les produits de salaison. Dans cette étude, nous avons démontré que ces souches pouvaient effectivement produire cette toxine sur le substrat jambon et que, de plus, la molécule formée est stable dans ce milieu puisque plus de 80% de la contamination initiale sont retrouvés après 8 jours d'incubation. Ce résultat souligne l'importance de tester le potentiel toxigène des souches fongiques utilisées en production de produits carnés, comme cela a déjà été recommandé en production fromagère (Le Bars et Le Bars, 1998). Par ailleurs, l'existence possible d'une flore toxigène sauvage sur des produits comme le jambon sec nécessite la réalisation de contrôles de la flore fongique des salaisons sèches

pendant la période d'affinage afin d'éviter tout risque de contamination mycotoxique du produit final.

**DÉTERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES DE
PRODUCTION DU DEOXYNIVALENOL ET DE LA ZEARALENONE**

Introduction

Le développement incontrôlé de la flore fongique contaminant un aliment, qu'il soit d'origine végétale ou animale, peut aboutir à la production et à l'accumulation de métabolites toxiques, les mycotoxines. L'évaluation du risque lié à la présence de ces contaminants naturels dans les aliments nécessite la réalisation d'intoxications expérimentales afin de caractériser la toxicité de ces molécules et de pouvoir définir les doses sans effet et les doses tolérables dans les aliments.

Si la toxicité de nombreuses mycotoxines est, désormais, bien caractérisée chez les rongeurs de laboratoire, leurs effets chez les animaux de production sont en général moins bien documentés, notamment les conséquences d'expositions chroniques. Les animaux dits « de rente » sont pourtant particulièrement exposés à ces contaminants du fait de leurs conditions d'élevage et de leur régime alimentaire, le plus souvent riche en céréales. Par ailleurs, l'étude de la toxicité chronique des mycotoxines dans ces espèces animales est importante puisqu'elle peut permettre de mettre en évidence d'effets zootechniques qui, sans mettre en péril la santé des animaux, peut avoir des répercussions économiques importante pour l'élevage et altérer la qualité des produits d'origine animale.

Ce constat peut s'expliquer par la quantité nécessaire de toxine nécessaire pour réaliser de telles études et le coût des toxines pures vendues commercialement. En effet, la réalisation d'une étude de toxicité chronique chez des animaux de grande taille (plusieurs kilogrammes) nécessite en général plusieurs dizaines de grammes de toxine.

Une stratégie alternative peut être d'utiliser des aliments ou des matières premières naturellement contaminés pour effectuer ces études. Il se pose alors le problème de la poly-contamination fréquente de ces aliments qui rend difficile l'interprétation des résultats obtenus et pratiquement impossible la reproduction d'un protocole expérimental.

Afin de pouvoir caractériser la toxicité des fusariotoxines chez les volailles, nous avons décidé de produire expérimentalement les toxines au laboratoire. Pour cela, après avoir isolé ou nous être procuré des souches fongiques fortement toxigènes, nous avons caractérisé les conditions optimales de production de ces métabolites.

Notre première étude sur la contamination fongique et mycotoxique des céréales produites en Roumanie a mis en évidence l'importance et la fréquence de la contamination de ces matières premières par le déoxynivalénol et la zéaralénone. Nous nous sommes donc attaché à déterminer les conditions optimales de production de ces deux molécules. Pour cela nous

avons étudié l'impact d'un certain nombre de paramètres environnementaux comme la température, l'Aw, le temps de culture, le substrat, ... sur la production de mycotoxine.

Matériel et méthodes

Solvants et réactifs

Les solvants utilisés étaient tous de qualité HPLC et ont été achetés chez Prolabo, (Paris, France). Les mycotoxines pures utilisées comme standard pour la quantification proviennent de Sigma (Saint Louis MO).

Souches fongiques

- La souche de *Fusarium graminearum* F6G10 productrice de DON nous a été fournie par le Docteur Laetitia Pinson de l'unité INRA Mycsa de Bordeaux. Cette souche a été isolée de blé tendre (variété Soisson) en 2001 en France. La souche a été purifiée par culture monosporelle et identifiée en utilisant selon la taxonomie classique sur la base de ses caractères morphologiques.

La caractérisation du potentiel toxigène de cette souche a été réalisée *in vitro* dans les conditions suivantes: culture pendant 21 jours sur blé stérile, à 25°C et à l'obscurité, Aw du milieu > 0,9. Dans ces conditions, le chemotype de cette souche est le suivant: production *in vitro* de 3476 ppm de DON et 13,5 ppm de 15-ADON et d'une faible quantité de Nivalénol (2,4 ppm) (Bakan *et al.*, 2001).

Cette souche est désormais référencée par l'ARS (Agricultural Research Service Culture Collection, Peoria, Illinois) sous la dénomination *Fusarium graminearum* F6G10

- La souche de *Fusarium graminearum* productrice de zéaralénone a été obtenue auprès de la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Allemagne) où elle est référencée sous le numéro DMSZ 1095. Cette souche a initialement été isolée du maïs. La caractérisation initiale de son potentiel toxigène a été effectuée, *in vitro*, sur milieu solide (maïs), incubé à 24°C pendant 14 jours (Bacon, 1977).

Culture fongique

Au laboratoire, les deux souches toxigènes ont été cultivées sur milieu PDA. Des tubes en pente, contenant du milieu PDA ont été ensemencés et conservés à 4°C. Ces tubes sont repiqués tous les deux mois pour s'assurer de la viabilité et de la pureté des souches fongiques.

Pour les essais de toxino-génèse, les souches sont mises en culture sur boîte de Petri contenant du milieu PDA. Après 1 semaine, ces boîtes sont utilisées pour l'inoculation des différents milieux destinés à tester la toxino-génèse. Pour cela, 3 morceaux de 1 cm² de gélose sont découpés et placés sur le milieu à tester: blé, maïs ou riz.

Les milieux de toxino-génèse sont composés de 50g de céréale (blé, riz ou maïs grossièrement broyé) auxquels sont ajoutés 50 ml d'eau distillée. Ce mélange est ensuite placé dans des boîtes de Petri en verre de 15 cm de diamètre ou dans des flacons de 500 cm³. Ces milieux sont stérilisés à 121°C pendant 30 min puis refroidis avant inoculation par les souches fongiques.

Les cultures ont ensuite été incubées à différentes températures (de 15 à 35°C) pendant des durées variables (de 1 à 8 semaines). Chaque semaine elles ont été contrôlées pour vérifier l'absence de développement d'une flore contaminante. En cas de développement de colonies suspectes, un examen morphologique microscopique a été effectué pour identifier les espèces fongiques présentes (Botton et al, 1990 ; Nelson et al. (1983), Pitt (2000), et. Raper et Fennell (1965)). En cas de développement fongique indésirable, les boîtes ont été détruites.

Extraction et purification du déoxynivalénol et de la zéaralénone

L'extraction du DON et de la ZEA a été réalisée par un mélange acétonitrile:eau distillée, 4% NaCl (84:16) ou avec un mélange méthanol: eau distillée, 1% NaCl (40:60) (Scott *et al.*, 1986 ; Trucksses *et al.*, 1987 ; Martins et Martins, 2002 ; Mateo *et al.*, 2002). Les deux mycotoxines ont été extraites à partir des 50 g de milieu de culture fongique auxquels ont été ajoutés 200 ml du mélange de solvant. Le mélange a été agités fortement puis filtrés sur papier filtre Whatman no. 1.

Le rendement d'extraction a été apprécié en utilisant des échantillons de blé, maïs et riz indemnes de mycotoxine et artificiellement contaminés par des quantités connues de DON (10 µg DON/kg) et de ZEA (20 et 200 µg ZEA/kg). Pour le DON, le rendement de l'extraction était de 89±4% en utilisant le mélange acétonitrile:eau distillée et de 87±9% avec la solution méthanol:eau distillée. Pour la ZEA, les rendements d'extraction ont été de 90±3% dans et de 88±6% en utilisant respectivement les mélanges acétonitrile:eau distillée et méthanol:eau distillée.

La purification du DON produit a été effectuée selon trois méthodes: colonne charbon:Al₂O₃:célite, 07:05:03 (Fernandez *et al.*, 1994; Trucksses *et al.*, 1984, 1987); colonne charbon:Al₂O₃, 0,75:0,75 (Tutelyan 1991, 2004) et colonne MycoSep (Malone, 1998; Berger *et al.*, 1999; Royer *et al.*, 2004). Pour les premières deux méthodes, les colonnes de

purification ont été préparées par passage de 10 ml d'acétonitrile:eau distillée, (84:16) puis 10 ml de filtrat ont été mis sur la colonne et elle a été éluées avec 10 ml d'acétonitrile:eau distillée (84:16); pour la troisième méthode, 5 ml de filtrat ont été directement passés sur la colonne MycoSep.

Le rendement de l'étape de purification du DON a été calculé en utilisant des extraits contenant une quantité fixée de DON (10 mg DON/kg).

La purification de la ZEA a été réalisée selon deux protocoles : colonne C18 et colonne de Romer (charbon-Al₂O₃-celite). Pour cela, les colonnes ont été conditionnées par 5 ml d'acétonitrile-eau (90:10), puis 5 ml d'extrait ont été passés et la toxine a été éluée par 10 ml d'acétonitrile-eau (90:10). Le rendement de purification pour la ZEA a été calculé en utilisant des extraits contenant des quantités connues de zéaralénone pure (20 et 200 µg/kg).

Les extraits purifiés ont été évaporés à sec sous un faible flux d'azote, puis re-dissous dans une solution acétonitrile:eau distillée (90:10). Chaque extrait a été dilué ou concentré pour être compatible avec la courbe de calibration.

Quantification du déoxynivalénol et de la zéaralénone

Le déoxynivalénol a été quantifié par chromatographie sur couche mince (Eppley *et al.*, 1984, 1986; Frayssinet et Fremi, 1991, Tutelyan 1991, 2004) et par HPLC (Fernandez *et al.*, 1994, Berger *et al.*, 1999; Yoshizawa 2001).

Pour la chromatographie en couche mince (CCM), 5µl des extraits filtrés et purifiés ont été déposés sur les plaques de silice (Merck nr 5553, VWR, Fontenay sous bois, France). Le développement a été exécutée dans deux bains successifs: éther éthylique:méthanol:eau distillée (96:3:1) puis, après séchage à température ambiante, toluène:éthyle acétate:acide formique : (60:30:10). Après séchage à température ambiante les plaques ont été pulvérisées avec du chlorure d'aluminium (20% en solution éthanolique 50%) et chauffées 10 min à 110°C. La quantification a été réalisée par fluorodensitométrie en utilisant un Fluorodensitomètre Shimadzu CS930 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japonia) à 330 nm. La quantité de DON a été calculée par comparaison à une gamme étalon déposée sur la même plaque. La limite de détection de cette méthode est de 25-50 µg DON/g pour les extraits purifiés.

Pour la quantification par HPLC, 30 µl d'extrait ou de standard ont été injectés. La séparation a été effectuée en utilisant une pompe M 2200 (ICS, Toulouse, France), une colonne Prontosil C18, 5 µm, 250x4 mm équipée avec une pré-colonne (ICS, Toulouse, France). La détection est réalisée en utilisant un Fluorimètre 8450 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japonia), à 330 nm. Les

conditions opératoires pour le DON ont été les suivantes: phase mobile acétonitrile:eau distillée (10:90), débit 1 ml/min, Ex 221 nm et Em 330 nm. Le temps de rétention a été de 3,5 min. La quantification a été obtenue par la mesure de l'aire des pics (système Pic3, ICS, Toulouse, France) et par comparaison avec les résultats obtenus avec les standards. La limite de quantification de cette méthode est de 0,2 µg/g pour le DON.

La zéaralénone a, elle aussi, été quantifiée par chromatographie sur couche mince (Hadiani *et al.*, 2003) et HPLC (Llorens *et al.*, 2002; Rosenberg *et al.*, 1998).

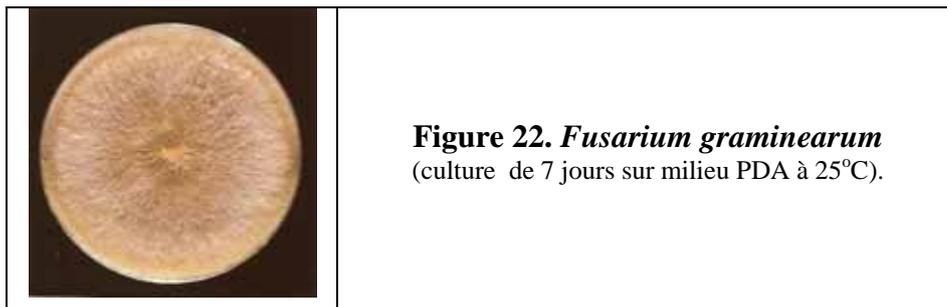
Pour la CCM, 3 µl d'extraits filtrés et purifiés ont été déposés sur les plaques de silice. Le développement a été effectué dans un mélange éther éthylique:méthanol:eau distillée (6:3:1, v/v/v). La quantification de la toxine a été réalisée par fluorodensitométrie à 313 nm pour la ZEA. La limite de détection de la zéaralénone dans les extraits de culture est de 40-50 µg/g.

Pour la quantification par HPLC, 20 µl d'extrait ou de standard ont été injectés dans le même système que celui utilisé pour le DON. Les dérivés alpha- et beta-zéaralenol ont aussi été quantifiés dans les extraits. Pour ces dosages, les conditions opératoires étaient les suivantes : phase mobile acétonitrile:eau distillée (45:55), débit 1.1 ml/min, Ex 235 nm et Em 440 nm. La quantification a été obtenue de la même façon que pour le DON. Les temps moyen de rétention ont été de 6 min (ZEA), 8 min (alpha-zéaralénol) et 16 min (beta-zéaralénol). La limite de quantification de cette méthode est de 0,1 µg/g pour la ZEA et ses dérivés.

Résultats et discussion

Identification de souches

Les caractéristiques macroscopiques et microscopiques des souches utilisées sont caractéristiques de l'espèce *Fusarium graminearum*: abondance des macroconidies fusiformes, courbes et septées avec une cellule terminale longue et pointue. Le mycélium développe une couleur rose au début puis rouge à pourpre (Figure 22).



Production de déoxynivalénol et zéaralénone

Pendant les 5 à 6 semaines d'incubation, les boîtes Petri et les flacons ont été contrôlés hebdomadairement pour confirmer l'absence de contamination par d'autres espèces fongiques. En effet, il a été démontré que le développement d'autres espèces sur un même milieu de culture peut diminuer la production de mycotoxine (Velluti *et al.*, 2000).

Influence du substrat sur la production de DON et ZEA

Le blé, le maïs et le riz ont été utilisés comme substrat pour la production de DON. La Figure 23 présente les niveaux de DON obtenus avec sur trois milieux pendant les 5 semaines d'incubation. Sur le plan du développement fongique, aucune différence notable de développement du mycélium n'a pas pu être notée. La quantité de DON produite a été supérieure après culture sur le maïs. Ces résultats sont en accord avec des études antérieures ayant comparé plusieurs milieux de culture pour la production de DON (Mateo *et al.*, 2002).

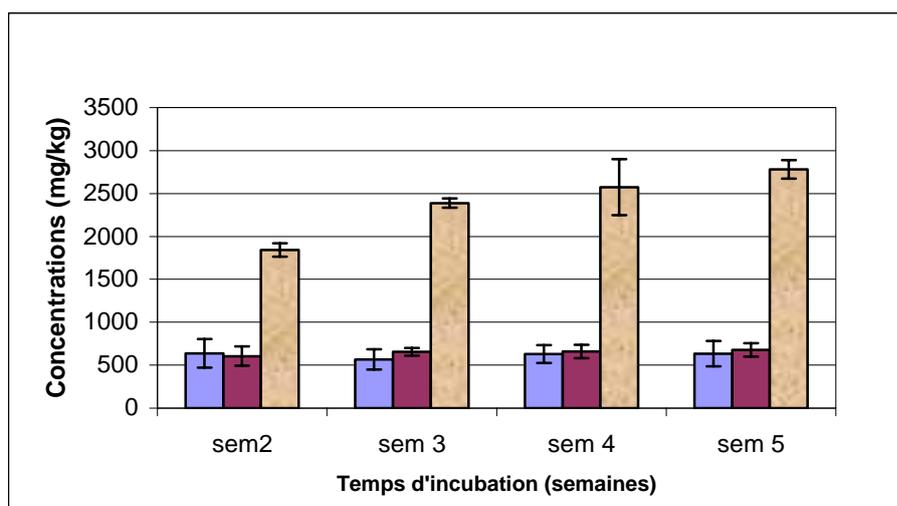


Figure 23. Niveau de production du DON après 5 semaines de culture sur maïs (v), riz (v) et blé (v).

Pour la production de zéaralénone, du riz et du maïs grossièrement broyé ont été utilisés. Après 6 semaines d'incubation, la production de ZEA obtenue est supérieure dans le maïs (Figure 24).

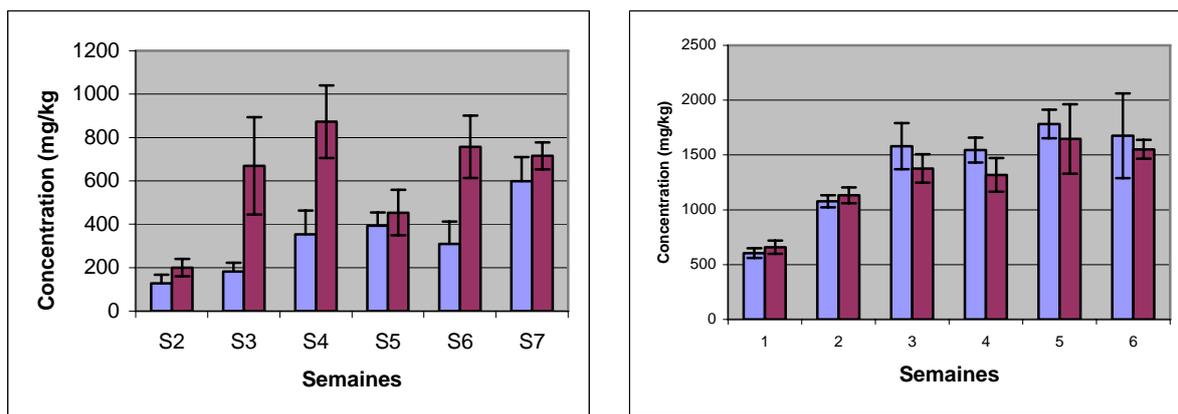


Figure 24. Production de ZEA après 6 semaines de culture sur riz (A) et maïs grossièrement broyé (B).

Les cultures ont été réalisées sur boîte de Petri (v) ou en flacon (r).

La Figure 24 montre également que la production de ZEA est plus importante dans les boîtes Petri (1783 $\mu\text{g/g}$ milieu de culture) que dans les flacons (1645 $\mu\text{g/g}$ milieu de culture). Ce phénomène est probablement à relier à l'aération, supérieure dans les boîtes de Petri comparé aux flacons.

Influence du couple durée/température de culture

La Figure 3 montre l'évolution de la production de DON en fonction du temps et de la température de culture.

La cinétique de production est biphasique : la teneur en DON dans le milieu de culture augmente pendant les 6 premières semaines de culture puis diminue progressivement. Ce résultat est en accord avec ceux observés pour d'autres mycotoxines (Fernandez *et al.*, 1994 ; Bailly *et al.*, 2005).

La production de DON est maximale pour des températures de 20 à 25°C. La toxinogénèse, bien que plus faible reste importante à 15°C. Par contre, l'élévation de la température (> 30°C) entraîne une inhibition de la synthèse de toxine.

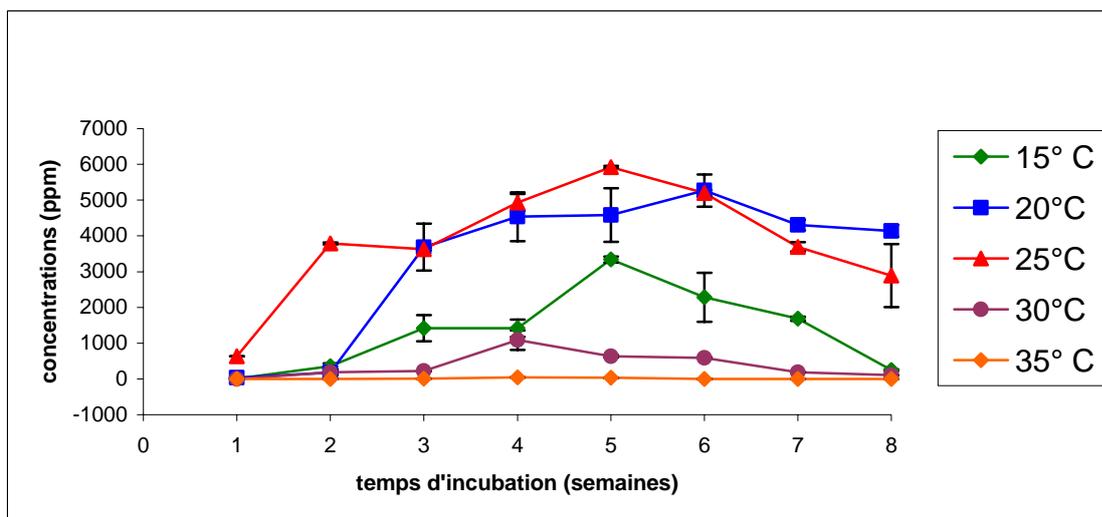


Figure 25. Cinétique de la production de DON en fonction du temps et de la température de culture.

La cinétique de production de la ZEA apparaît comparable avec une augmentation progressive pendant les 5 à 6 premières semaines d'incubation avant de décroître dans le milieu (résultats non montrés). De même, la température influe sur la production de la toxine dans les mêmes proportions que pour le DON. La production est optimale à 20-25°C puis décroît rapidement si la température s'élève au delà de 30°C.

Dans les conditions optimales de production, nos souches fongiques ont permis de produire des quantités d'environ 5000 mg DON/kg de milieu de culture et de 1700 mg ZEA/kg milieu de culture. Ces concentrations sont compatibles avec la production de quantité de toxines suffisantes pour pouvoir en étudier l'effet chez des animaux de rente. Toutefois, il convient de souligner que nous avons eu beaucoup de difficultés à reproduire ces résultats, au moins en ce qui concerne le DON. Nous n'avons à ce jour pas pu identifier les facteurs qui sont à l'origine de ces difficultés. Il semble que les souches de *Fusarium* soit particulièrement difficiles à conserver longtemps dans les conditions de laboratoire et qu'elles perdent, après quelques mois, leur potentiel toxigène.

Les extraits obtenus contiennent de grandes quantités de toxines. Toutefois, un certain nombre d'impuretés sont aussi co-extraites avec les molécules d'intérêt. Outre le fait que ces molécules co-extraites peuvent gêner la quantification des mycotoxines, elles peuvent aussi avoir une activité biologique susceptible d'interférer avec l'effet des mycotoxines. Aussi,

nous nous sommes attachés à déterminer les conditions optimales de purification de ces extraits.

Purifications des extraits

Pour le DON, trois protocoles de purification ont été testés. Les trois méthodes permettent d'éliminer les pigments présents dans les extraits. Le rendement de purification obtenu était de 72-83% après passage sur colonnes charbon:Al₂O₃:célite (07:05:03) et de 76-89% en utilisant les colonnes charbon:Al₂O₃ (0,75:0,75); Avec les colonnes MycoSep, le rendement de la purification de l'extrait était seulement de 65-67%. L'explication de ce faible rendement peut être la grande quantité de toxine présente dans les extraits. En effet, ces colonnes sont destinées à la purification d'extraits naturellement contaminés et il est probable que nos extraits ont saturé les colonnes.

Pour la ZEA, la purification des extraits par la colonne de charcoal-Al₂O₃-celite et la colonne C18 ont permis d'éliminer une grande partie des substances co-extraites avec les toxines. Le rendement de purification est très élevé avec la colonne C18 (91,07±4%). Pour la colonne de charcoal-Al₂O₃-celite la qualité de la purification est similaire mais le rendement du processus est seulement de 55-56%.

En conclusion, la culture de souches fortement toxigènes de *Fusarium graminearum* pendant 5-6 semaines à 20°C sur riz (DON) ou maïs (ZEA) permet de produire des quantités de toxines compatibles avec la réalisation d'intoxications expérimentales. Les conditions hydro-thermiques optimales à cette synthèse mycotoxique sont fréquemment rencontrées en Europe, et correspondent tout particulièrement aux conditions climatiques rencontrées au printemps et en début d'été en Roumanie, ce qui explique la prévalence de ces contaminant dans les céréales produites dans ce pays.

L'utilisation de colonnes Charbon-Al₂O₃ (DON) et C18 permet d'obtenir des extraits purifiés, indemne de tout pigment ou substance co-extraite.

CONCLUSION GENERALE

Les moisissures sont des microorganismes ubiquistes susceptibles de contaminer de nombreux produits destinés à l'alimentation des animaux ou des hommes.

Les céréales sont, sans doute, les matières premières les plus exposées à la contamination fongique. Le développement fongique sur ces substrats peut avoir plusieurs conséquences : altération des propriétés organoleptiques, diminution des qualités nutritives, apparitions de maladies (allergies et mycoses) ou accumulation de composés toxiques (mycotoxines).

Les espèces les plus fréquentes appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* et leur proportion respective peut grandement varier en fonction des conditions climatiques dans lesquelles ces végétaux sont cultivés et récoltés ainsi que des conditions hydrothermiques observées pendant le stockage. Les moisissures peuvent aussi se développer sur les produits d'origine animale pendant la période d'affinage, après que le séchage ait entraîné une diminution de l'activité hydrique et un arrêt du développement bactérien.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence la flore fongique de différents substrats végétaux ou animaux. De façon générale, nos résultats sont en accord avec les données pré-existantes dans la littérature. Toutefois, nous avons aussi mis en évidence, sur les céréales cultivées en Roumanie une forte prévalence d'espèces fongiques appartenant au genre *Aspergillus*, flore plus généralement associée aux pays chauds.

La conséquence possible d'un développement fongique incontrôlé est la production et l'accumulation de mycotoxines dans les aliments. Nous avons montré que les céréales pouvaient être contaminées par certaines mycotoxines, parfois à des teneurs élevées, supérieures aux normes réglementaires en vigueur en Europe. Nos travaux ont notamment permis de mettre en évidence une contamination fréquente et régulière des céréales produites en Roumanie avec l'Aflatoxine B1. Ces résultats, associés aux différentes alertes rapportées notamment en Italie après des étés chauds, justifient que l'on se préoccupe toujours de ce contaminant, y compris en Europe, où le climat peut parfois être favorable à l'apparition de cet agent cancérigène.

Nos travaux ont aussi montré que les aliments carnés affinés ne représentent pas un milieu favorable à la production de mycotoxines. Toutefois, nous avons montré que le développement de certaines espèces fongique sur ces substrats pouvait conduire à

l'accumulation d'acide cyclopiazonique, molécule ensuite très stable sur ces substrats. Il existe peu de données sur le niveau de contamination des aliments par cette molécules et, si la toxicité aiguë de cette mycotoxine est certainement plus faible que celles des toxines les plus étudiées, il semblerait important de disposer de données sur la toxicité chronique, à long terme de ce contaminant afin de pouvoir évaluer le risque d'une éventuelle contamination des aliments de façon précise.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas H.K., Williams W.P., Windham G.L., Pringle H.C. 3rd, Xie W., Shier W.T.,** (2002), Aflatoxin and fumonisin contamination of commercial corn (*Zea mays*) hybrids in Mississippi, *J. Agric. Food Chem.*, 50 (18), 5246-5254
- Abbas H.K., Ocamb C.M.,** (1995), First report of production of fumonisin B₁ by *Fusarium polyphialidium* collected from seeds of *Pinus strobes*, *Plant Dis.*, 79, 642-645
- Abbas H.K., Ocamb C.M., Xie W.P., Mirocha C.J., Shier W.T.,** (1995), First report of fumonisins B₁, B₂ and B₃ produced by *Fusarium oxysporum var redolens*, *Plant Dis.*, 79, 968-973
- Abbas H.K., Smeda R.J., Duke S.O., Shier, W.T.,** (1997), Fumonisin-Plant interactions, *Bulletins of the Institute for Comprehensive Agricultural Sciences*, Kinki University, 5, 63-73.
- Abdulkadar A.H.W., Abdulla A. Al-Ali, Afrah M. Al-Kildi, Jassim H. Al-Jedah,** (2004), Mycotoxins in food products available in Qatar, *Food Control*, 15, 543-548
- Abouzed M.M., Horvath A.D., Podlesny P.M., Regina N.P., Metodiev V.D., Kamenova-Tozeva R.M., Niagolova N.D., Stein A.D., Petropoulos E.A., Ganev V.S.,** (2002), Ochratoxin A concentrations in food and feed from a region with Balkan Endemic Nephropathy, *Food Addit Contam.*, 19 (8), 755-764
- Adebajo L.O., Idowu A.A., Adesanya O.O.,** (1994), Mycoflora, and mycotoxins production in Nigerian corn and corn-based snacks, *Mycopathologia*, 126 (3); 183-192
- Adejumo T.O., Hettwer U., Karlovsky P.,** (2007), Occurrence of *Fusarium* species and trichothecenes in Nigerian maize, *Int. J. Food Microbiol.*, 116 (3), 350-357
- AFSSA,** (2006), "Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique"
- Ah Seo J., Lee Y.W.,** (1999), Natural Occurrence of the C Series of Fumonisin in Moldy Corn, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (3), 1331-1334
- Aksenov I.V., Eller K.I., Tutelyian V.A.,** (2006), Ochratoxin A contamination of cereal grain harvested in 2003 and 2004 years, *Vopr Pitan.*, 75 (1), 43-47
- Ali N., Sardjono, Yamashita A., Yoshizawa Y.,** (1998), Natural co-occurrence of aflatoxin and *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia, *Food Addit. Contam.*, 15 (4), 377-384
- Allen N.K., Peguri A., Mirocha C.J., Newman J.A.,** (1983), Effects of *Fusarium* cultures, T-2 toxin and zearalenone on reproduction of turkey females, *Poult. Sci.*, 62 (2), 282-289
- Allen N.K.,** (1980), Effect of zearalenone on reproduction of chickens, *Poult. Sci.*, 59, 1577

- Allen N.K., Mirocha C.J., Weaver G., Aakhus-Allen S., Bates F.,** (1981), Effects of zearalenone on finishing broiler chickens and young turkey poults, *Poult. Sci.*, 60, 124-127.
- Almeida A.P., Fonseca H., Fancelli A.L., Direilo G.M., Ortega G.M., Correa B.,** (2002), Mycoflora and fumonisins in brazilian corn from sowing to harvest, *J. Agric. Food. Chem.*, 50 (13), 3877-3882
- Arino A., Juan T., Estopanan G., Gonzales-Cabo J.F.,** (2007), Natural Occurrence of *Fusarium* Species, Fumonisin Production by Toxigenic Strains, and Concentrations of Fumonisin B1 and B2 in Conventional and Organic Maize Grown in Spain, *J. Food Prot.*, 70 (1), 151-156
- Arora R.G., Frölen H., Nilsson Z.A.,** (1981), Interference of mycotoxins with prenatal development of the mouse. I Influence of aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenone, *Acta Vet. Scand.*, 22, 524-534.
- Autrup, J.L., Schmidt, J., Seremet, T., Autrup, H.,** (1991), Determination of exposure to aflatoxins among Danish workers in animal-feed production through the analysis of aflatoxin B1 adducts to serum albumin. *Scand. J. Work Environ. Health*, 17, 436-440
- Ayalew A., Fehrmann H., Lepschy J., Beck R., Abate D.,** (2006), Natural occurrence of mycotoxins in staple cereals from Ethiopia, *Mycopathologia*, 162 (1), 57-63
- Bacon C.Z., Robbins J.D., Porter K.J.,** (1977), Media for identification of *Gibberella zeae* and production of F-2 (zearalenone), *Appl. Environ. Microbiol.*, 33 (2), 445-449
- Baculard A., Tournier G.,** (1995), Aspergilloses broncho-pulmonaires et mucoviscidose, *Rev. Pneumol. Clin.*, 51, 159-162
- Badillet G., de Briève C., Guého E.,** (1987), Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, *Atlas clinique et biologique*, vol II, Ed VARIA, Paris
- Bailly J.D., Raymond I., Le Bars P., Guyomard Y., Abadie J., Le Bars J., Guerre P., Delverdier M., Burgat V.,** (1996), Leucoencéphalomalacie des équidés : cas rapportés au CNITV, *Rev. Méd. Vét.*, 147, 787-796.
- Bailly J.D., Querin A., Tardieu D., Guerre P.,** (2005), Production and purification of fumonisins from a highly toxigenic *Fusarium verticilloides* strain, *Rev. Med. Vet.*, 156 (2), xxx-xxx.
- Bakan B., Pinson L., Cahagnier B., Melcion D., Semon E., Richard-Molard D.,** (2001), Toxigenic potential of *Fusarium culmorum* strains isolated from French wheat, *Food Addit. Contam.*, 18 (11), 998 - 1003
- Baliukoniene V., Bakutis B., Stankevicius H.,** (2003), Mycological and Mycotoxicological evaluation of grain, *Ann. Agric. Environ. Med.*, 10, 223-227
- Bankole S.A., Mabekoje O.O.,** (2004), Occurrence of aflatoxin and fumonisins in preharvest maize from south-western Nigeria, *Food Addit. Contam.*, 21 (3), 251-255

Battilani P., Pietri V.A., Giorni P., Formenti S., Bertuzzi T., Toscani T., Virgili R., Kozakiewicz Z. (2007), *Penicillium* populations in dry-cured ham manufacturing plants, *J. Food Prot.*, 70, 975-980.

Baydar T., Engin A.B., Girgin G., Aydin S., Sahim G., (2005), Aflatoxin and ochratoxin in various types of commonly consumed retail ground samples in Ankara, Turkey, *Ann. Agric. Environ. Med.*, 12, 193-197

Becker B.A., Pace L., Rottinghaus G.E., Shelby R., Misfeldt M., Ross P.F., (1995), Effect of feeding fumonisin B₁ in lactating sows and their suckling pigs, *Am. J. Vet. Res.*, 56, 1253-1258

Bejaoui H., Mathieu F., Taillandier P., Lebrihi A., (2006), Black *aspergilli* and ochratoxin A production in French vineyards, *Int. J. Food Microbiol.*, 111 (1), 46-52

Bennett J.W., Klich M., (2003), Mycotoxins, *Clin. Microbiol. Rev.*, 16, 497-516

Berger U., Oehme M., Kuhn F., (1999), Quantitative determination and structure elucidation of type A and B trichothecenes by HPLC/IO trap multiple mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 47 (10), 4240-4245

Bognanno M., La Fauci L., Ritieni A., Tafuri A., De Lorenzo A., Micari P., Di Renzo L., Ciappellano S., Sarullo V., Galvano F., (2006), Survey of the occurrence of Aflatoxin M₁ in ovine milk by HPLC and its confirmation by MS, *Mol. Nutr. Food Res.*, 50 (3), 300-305

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

Boysen M.E., Jacobsson K.G., Schnürer J., (2000), Molecular Identification of Species from the *Penicillium roqueforti* Group Associated with Spoiled Animal Feed, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (4), 1523-1526

Breitholtz-Emanuelsson A., Fuchs R., Hult K., (1995), Toxicokinetics of ochratoxin A in rat following intratracheal administration, *Natural Toxins*, 3, 101-103

Bucci T.J., Howard P.C., (1996), Effect of fumonisin mycotoxins in animals, *J. Toxicol.-Toxin rev.*, 15, 293-302.

Cahagnier B., Richard-Molard D., (1998), Analyse mycologique in *Moisissures des aliments peu hydratés*, Ed. Tec & Doc, p 140-158

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, *J. Appl. Microbiol.*, 99, 1215-1221

Campbell C.K., Johnson E.M., Philpot C.M., Warnock D.W., (1996), Identification of pathogenic fungi, *Public Health Laboratory Service*

Carvajal M., Bolaños A., Rojo F., Méndez I., (2003), Aflatoxin M₁ in pasteurized and ultrapasteurized milk with different fat content in Mexico, *J. Food Prot.*, 66 (10), 1885-1892

- Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A.,** (2002), Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*, Lavoisier, Tec&Doc
- Castoria R., Lima G., Ferracane R., Ritieni A.,** (2005), Occurrence of mycotoxin in Farro samples from southern Italy, *J Food Prot.*, 68 (2), 416-420
- Chatterjee D., Mukherjee S.K.,** (1994), Contamination of Indian maize with fumonisin B₁ and its effects on chicken macrophage, *Lett. Appl. Microbiol.*, 18, 251-253.
- Chatterjee D., Mukherjee S.K., Dey A.,** (1995), Nuclear disintegration in chicken peritoneal macrophage exposed to fumonisin B₁ from indian maize, *Lett. Appl. Microbiol.*, 20, 184-185.
- Chermette R., Bussieras J.,** (1993), Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort
- Chi M.S., Mirocha C.J., Weaver G.A., Kurtz H.J.,** (1980), Effect of zearalenone on female White Leghorn hens, *Appl. Environ. Microbiol.*, 39 (5), 1026-1030
- Chulze S.N., Magnoli C.E., Dalcero A.M.,** (2006), Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America, *Int J Food Microbiol.*, 111 (1), 5-9
- Cirillo T., Ritieni A., Galvano F., Amodio Cocchieri R.,** (2003), Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B₁ and B₂ in Italian marketed foodstuffs, *Food Addit Contam.*, 20 (6), 566-571
- Cole R.J., Cox R.H.,** (1981), Handbook of Toxic Fungal Metabolites, New York, Academic Press
- Colvin B.M., Cooley M., Beaver R.W.,** (1993), Fumonisin toxicosis in swine: clinical and pathologic findings, *J. Vet. Diagn. Invest*, 5, 232-241.
- Comi G., Orlic S., Redzepovic S., Urso R., Iacumin L.,** (2004), Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level, *Int. J. Food Microbiol.*, 96, 29-34
- Coppock R.W., Swanson S.P., Gelberg H.B., Koritz G.D., Hoffman W.E., Buck W.B., Vesonder B.S.,** (1985), Preliminary study of the pharmacokinetics and toxicopathy of deoxynivalenol (vomitoxin) in swine, *Am. J. Vet. Res.*, 46 (1), 169-174
- Coulombe R.A.,** (1993), Biological action of mycotoxins, *J. Dairy Sci.*, 76, 880-891
- Curtui V., Usleber E., Dietrich R., Lepschy J., Martlbauer E.,** (1998), A survey of the occurrence of mycotoxins in wheat and maize from western Romania, *Mycopathol*, 143, 97-103
- Dacasto M., Rolando P., Nachtmann C., Ceppa L., Nebbia C.,** (1995), Zearalenone mycotoxicosis in piglets suckling sows fed contaminated grain, *Vet. Human Toxicol.*, 37, 359-361.

- Dalcero A., Magnoli C., Chiacchiera S., Palacios G., Reynoso M.,** (1997), Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina, *Mycopathologia*, 137 (3), 179-184
- Dalcero A., Magnoli C., Hallak C., Chiacchiera S.M., Palacio G., Rosa C.A.,** (2002), Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina, *Food Addit Contam.*, 19(11), 1065-1072
- Dalcero A., Magnoli C., Luna M., Ancasi G., Reynoso M.M., Chiacchiera S., Miazzo R., Palacio G.,** (1998), Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina, *Mycopathologia*, 141 (1), 37-43
- De Aguirre L., Hurst S.F., Choi J.S., Shin J.H., Hinrikson H.P., Morrison C.J.,** (2004), Rapid Differentiation of *Aspergillus* Species from Other Medically Important Opportunistic Molds and Yeasts by PCR-Enzyme Immunoassay, *J. Clin. Microbiol.*, 42 (8), 3495-3504
- De Castro M.F., Shephard G.S., Sewram V., Vicente E., Mendonça T.A., Jordan A.C.,** (2004), Fumonisin in Brazilian corn-based foods for infant consumption, *Food Addit Contam.*, 21 (7), 693-699
- De Hoog G.S., Guarro J.,** (1995), Atlas of clinical fungi, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Pays-Bas
- De Sylos C.M., Rodriguez-Amaya D.B., Carvalho P.R.,** (1996), Occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil, *Food Addit. Contam.*, 13 (12), 169-172
- Del Palacio H.A., Guttierrez A., Guttierrez E.,** (1985), Ulcera corneal por *Fusarium solani*, *Rev. Iber. Micol.*, 2, 29-35
- Desmazeaud M.J., Gripon J.C., Le Bars D., Bergere J.L.,** Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages, *Lait*, 1976, 56, 379-396.
- Di Paolo N., Guarnieri A., Loi F., Sacchi G., Mangiarotti A.M., Di Paolo M.,** (1993), Acute renal failure from inhalation of mycotoxins, *Nephron*, 64, 621-625
- Dial S.M.,** (2007), Fungal diagnostics: current techniques and future trends, *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 37(2):373-92
- Diaz G.J., Boermans H.J.,** (1994), Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review, *Vet. Hum. Toxicol*, 36, 548-555.
- Diaz G.J., Espitia E.,** (2006), Occurrence of aflatoxin M1 in retail milk samples from Bogotá, Colombia, *Food Addit. Contam.*, 23 (8), 811-815
- Diekman M.A., Green M.L.,** (1992), Mycotoxins and reproduction in domestic livestock, *J. Anim. Sci.*, 70, 1815-1827
- DiMello J.P.F., Parker J.K., MacDonald A.M.C., Placinta C.M.,** (1997), Fusarium mycotoxins in DiMello J.P.F., Ed. "Handbook of plant and fungal toxicants", CRC Press, Boca Raton FL, 287-301

Domijan A.M., Peraica M., Jurjevic Z., Ivic D., Cvjetkovic B., (2005), Fumonisin B1, fumonisin B2, zearalenone and ochratoxin A contamination of maize in Croatia, *Food Addit Contam.*, 22 (7), 677-680

Domijan A.M., Peraica M., Cvjetkovic B., Turcin S., Jurjevic Z., Ivic D., (2005), Mould contamination and co-occurrence of mycotoxins in maize grain in Croatia. *Acta Pharm.* 55, 349-356.

Duran J.A., Malvar A., Pereiro M., Pereiro Jr. M., (1989), *Fusarium moniliforme* keratitis, *Acta ophthalmol., Scand.* 67, 710-713

Ehrlich K.C., Kobbeman K., Montalbano B.G., Cotty, P.J., (2007), Aflatoxin producing *Aspergillus* species from Thailand. *Intern. J. of Food Microbiol.* 114, 153-159.

El-Dessouki S., (1992), Ochratoxin A in beer, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 11, 354-355.

Elgerbi A.M., Aidoo K.E., Candlish A.A., Tester R.F., (2004), Occurrence of aflatoxin M1 in randomly selected North African milk and cheese samples, *Food Addit. Contam.*, 21 (6), 592-597

Engel G., Teuber M., Toxic metabolites from fungal cheese starter cultures (*Penicillium camemberti* and *P. roqueforti*). In *Mycotoxins in dairy products*, Van Egmond (H.P.), Elsevier Appl. Sci., London and N.Y., 1989, 163-192

Engelhardt G., Barthel J., Sparrer D., (2006), *Fusarium* mycotoxins and ochratoxin A in cereals and cereal product: results from the Bavarian Health and Food Safety Authority in 2004, *Mol. Nutr. Food Res.*, 50, 401-405

Eppley R.M., Trucksess M.W., Nesheim S., Thorpe C.W., Wood G.E., Pohland A. E., (1984), Deoxynivalenol in winter wheat: thin layer chromatographic method and survey, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67 (1), 43-45

Eppley R.M., Trucksses M.W., Nesheim S., Thorpe C.W., Pohland A.E., (1986), Thin layer chromatographic method for determination of deoxynivalenol in wheat: collaborative study, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69 (1), 37-40

Escoula L., (1992), Patulin production by *Penicillium granulatum* and inhibition of ruminal flora, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 11, 45-48.

Espada Y., Ruiz de Gopegui R., Cuadradas C., Cabanes F.J., (1997), Fumonsin mycotoxicosis in broilers : plasma proteins and coagulation modifications, *Avian Dis.*, 41, 73-79.

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

Etienne M., Dourmad J.Y., (1994), Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: A review, *Livestock Production Sci.*, 40, 99-113.

European Union. 2005. Commission regulation 856/2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards *Fusarium* toxins. *Off. J. E. U.* 143 : 3-8.

- Fandohan P., Gnonionfin B., Hell K., Marasas W.F., Wingfield M.J.**, (2005), Natural occurrence of *Fusarium* and subsequent fumonisin contamination in preharvest and stored maize in Benin, *Int. J. Food Microbiol.* 99, 173-183
- Ferdandez C., Stack M.E., Musser S.M.**.(1994), Determination of the deoxynivalenol in 1991 US winter and spring wheat by high performance thin layer chromatography, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 77 (3), 628-630
- Fazekas B., Tar A.**, (2001), Determination of zearalenone content in cereals and feedstuffs by immunoaffinity column coupled with liquid chromatography, *J. AOAC Int*, 84 (5), 1453-1459
- Fazekas B., Tar A.K., Zomborszky-Kovács M.**, (2002), Ochratoxin a contamination of cereal grains and coffee in Hungary in the year 2001, *Acta Vet Hung.*, 50 (2), 177-188
- Feuilhade de Chauvin M.**, (2005), New diagnostic techniques, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 19 (1), 20-24
- Filtenborg O., Frisvad J.C., Thrane U.**, (1996), Moulds in food spoilage, *Int. J. Food Microbiol.*, 33(1), 85-102
- Floss J.L., Casteel S.W., Johnson G.C., Rottinghaus G.E., Krause G.F.**, (1994 a) Developmental toxicity in hamsters of an aqueous extract of *Fusarium moniliforme* culture material containing know quantities of fumonisin B₁, *Vet. Hum. Toxicol.*, 36, 5-10.
- Floss J.L., Casteel S.W., Johnson G.C., Rottinghaus G.E., Krause G.F.**, (1994 b) Developmental toxicity of fumonisin in Syrian hamsters. *Mycopathologia*, 128, 33-38
- Frayssinet C., Fremi J.M.**, (1991), Dosage des mycotoxines. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires: Analyse des constituants alimentaires, Ed. Lavoisier Tec. Et Doc., Paris, 349 - 370
- Fujii S., Ribeiro R.M., Scholz M.B., Ono E.Y., Prete C.E., Itano E.N., Ueno Y., Kawamura O., Hirooka E.Y.**, (2006), Reliable indirect competitive ELISA used for a survey of ochratoxin A in green coffee from the North of Paraná State, Brazil, *Food Addit Contam.*, 23 (9), 902-909
- Galvano F., Galofaro V., Ritieni A., Bognanno M., De Angelis A., Galvano G.**, (2001), Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Italy: second year of observation, *Food Addit. Contam.*, 18(7), 644-646
- Gang G., Miedaner T.**, (1998), Deoxynivalenol and nivalenol production by *Fusarium culmorum* isolates differing in aggressiveness toward winter rye, *Phytopathol.*, 88 (9), 879-884
- Gao J., Liu Z., Yu J.**, (2007), Identification of *Aspergillus* section *flavi* in maize in northeastern China, *Mycopathologia*, 11, in press.
- Gareis M.**, (1996), Fate of ochratoxin A on processing of meat products, *Food Addit. Contam.*, 13, 35-37
- Gareis M., Schothorst R., Vidnes A., Bergsten C., Paulsen B.**, (2003), Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population

of E.U. member states, Report of SCOOP task 3.2.10, Available at <http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf>

Gari-Toussaint M., Leguay J.M., Zur C., Michiels J.F., Ferraen L., Negre S., Le Fichoux Y., (1997), Keratite à *Fusarium solani* chez une patiente diabétique, *J. Mycol. Med.*, 7, 227-231

Garon D., Richard E., Sage L., Bouchart V., Pottier D., Lebailly P., (2006), Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: experimental study, *J. Agric. Food Chem.*, 54 (9), 3479-3484

Garrido N.S., Iha M.H., Santos Ortolani M.R., Duarte Fávoro R.M., (2003), Occurrence of aflatoxins M(1) and M(2) in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil, *Food Addit Contam.*, 20 (1), 70-73

Gelderblom W.C., Galendo D., Abel S., Swanevelder S., Marasas W.F., Wild C.P., (2001), Cancer initiation by fumonisin B1 in rat liver: role of cell proliferation, *Cancer Lett.*, 169, 127-137

Gentry P.A., Ross M.L., Chan P.K.C., (1984), Effect of T-2 toxin on hematological and serum enzymes parameters, *Vet Hum Toxicol.*, 26 (1), 24-28.

Ghiasian S.A., Kord-Bacheh P., Rezayat S.M., Maghsood A.H., Taherkhani H., (2004), Mycoflora of Iranian maize harvested in the main production areas in 2000, *Mycopathologia*, 158 (1), 113-121

Giorni P., N. Magan, Pietri A, Bertuzzi T., Battilani P., (2007) Studies on *Aspergillus* section *flavi* isolated from maize in northern Italy, *Int. J. Food Microbiol.*, 113, 330-338

Greene M.L., Diekman L.A., Malayer J.R., Scheidt A.B., Long G.G., (1990), Effect of prepuberal consumption of zearalenone on puberty and subsequent reproduction of gilts, *J. Anim. Sci.*, 68, 171-178

Guarro J., Gene J., (1992), *Fusarium* infections, Criteria for the identification of the responsible species, *Mycoses*, 35, 109-114

Günsen U., Büyükyörük I., (2002), Aflatoxins in retail food products in Bursa, Turkey, *Vet Hum Toxicol.*, 44 (5), 289-290

Ha M.V., (1997), Some particularities of hepatobiliary diseases in Vietnam, *J. of Gastroenterology and Hepatology*, 12, S15-18.

Hadiani M.R., Yazdanpanah H., Ghazi-Khansari M., Cheraghali A.M., Goodarzi M., (2003), Survey of the natural occurrence of zearalenone in maize from northern Iran by thin layer chromatography densitometry, *Food Addit. Contam.*, 20 (4), 380-385

Hageskal G., Knutsen A.K., Gaustad P., de Hoog G.S., Skaar I., (2006), Diversity and Significance of Mold Species in Norwegian Drinking Water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (12), 7586-7593

- Harvey R.B., Kubena L.F., Elissalde M.H., Rottinghaus G.E., Corrier D.E.,** (1994), Administration of ochratoxin A and T-2 toxin to growing swine, *Am. J. Vet. Res.*, 55 (12), 1757-1761
- Hayaloglu A.A., Kirbag S.,** (2007), Microbial quality and presence of moulds in Kuflu cheese, *Int. J. Food Microbiol.*, 115(3), 376-80
- Healy M., Reece K., Walton D., Huong J., Frye S., Raad II, Kontoyiannis D.P.,** (2005), Use of the DiversiLab System for Species and Strain Differentiation of *Fusarium* Species Isolates, *J. Clin. Microbiol.*, 43 (10), 5278-5280
- Hennequin C., Lavarde V.,** (1998), Infections à *Penicillium*, *Encycl. Med. Chir.* (Elsevier, Paris), *Maladies Infectieuses*, 850-A-11
- Hennigen M.R., Dick T.,** (1995), Incidence and abundance of mycotoxins in maize in Rio Grande do Sul, Brazil, *Food. Addit. Contam.*, 12 (5), 677-681
- Hernandez E., Huerta T.,** (1993), Evolution of the microbiological parameters of cured ham, *Microbiologia*, 9, 10-19
- Hinoshita F., Suzuki Y., Yokoyama K., Hara S., Yamada A., Ogura y., Hashimoto H., Tomura S., Marumo F., Ueno Y.,** (1997), Experimental IgA nephropathy induced by low doses enviromental mycotoxin, nivalenol, *Nephron.*, 75, 469-478
- Hinrikson H.P., Hurst S.F., De Aguirre L., Morrison C.J.,** (2005), Molecular methods for the identification of *Aspergillus* species, 43 (1), 129-137
- Horn B.W., Wicklow D.T.,** (1983), Factors influencing the inhibition of aflatoxin production in corn by *Aspergillus niger*, *Can. J. Microbiol.*, 29, 1087-1091
- 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, *J. Econ. Entomol.*, 97(6), 2144-2153
- Hufstedler G.D., Gillman P.L., Corstens G.E., Green L.W., Turner N.D.,** (1996), Physiological and hormonal response of lambs repeatedly implanted with zeranol and provided two levels of feed intake, *J. Anim. Sci.*, 74, 2376-2384
- I.A.R.C.** (1993), Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, *In Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human*, World Health Organization, Lyon, France.
- IARC** (2000) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. List of IARC evaluations. IARC, Lyon
- Isebaert S., Haesaert G., Devreese R., Maene P., Fremaut F., and Vlaemynck G.,** (2005), *Fusarium spp* and *Fusarium* mycotoxins in maize: a problem for Flanders?, *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.*, 70, 129-136.
- Islam Z., Nagase M., Yoshizawa T., Yamauchi K., Sakato N.,** (1998), T-2 toxin induces thymic apoptosis in vivo in mice, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 148 (2), 205-14.

- Ito Y., Ohtsubo K.**, (1997), Effects of neonatal administration of zearalenone on the genital organs of female mice, *Cereal Res. Commun.*, 25, 3, 453-454.
- Izmail M.A., Zaki Z.M.**, (1999), Evaluation of the mycological status of luncheon meat with special reference to aflatoxigenic moulds and aflatoxin residues, *Mycopathologia*, 146 (3), 147-154
- Janardhana G.R., Raveesha K.A., Shetty H.S.**, (1999), Mycotoxin contamination of maize grains grown in Karnataka (India), *Food Chem. Toxicol.*, 37, 863-868
- JECFA**, (2001), Safety evaluation of certain mycotoxins in food, Fifty-six report. WHO Technical Report Series, Geneva, 47.
- Jin J., Lee Y.K., Wickes B.L.**, (2004), NOTES Simple Chemical Extraction Method for DNA Isolation from *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergillus* Species, *J. Clin. Microbiol.*, 42 (9), 4293-4296
- Jorgensen K.**, (1998), Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A, *Food Addit. Contam.*, 5, 550-554.
- Juszkiewicz T., Piskorska-Pliszczynska J.**, (1992), Occurrence of mycotoxins in animal feeds, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 11 (4), 211-215
- Kaaya A.N., Kyamuhangire W.**, (2006), The effect of storage time and agroecological zone on mould incidence and aflatoxin contamination of maize from traders in Uganda, *Intern. J. of Food Microbiol.*, 110, 217-223.
- Kaliamurthy J., Geraldine P., Thoams P.A.**, (1997), Effect of zearalenone on food consumption, growth rate, organ weight and serum testosterone level in male rats, *J. Environ. Biol.*, 18, 115-120.
- Kedera C.J., Plattner R.D., Desjardins A.E.**, (1999), Incidence of *Fusarium* spp. and Levels of Fumonisin B1 in Maize in Western Kenya, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, (1), 41-44
- Keller S.E., Sullivan T.M., Chirtel S.**, (1997), Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH, *Indust. Microbiol. Biotechnology*, 19, 305-309
- Khan Zu, Kortom M., Marouf R., Jamal W., Chandy R.**, (1999), Fatal pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*, *J. Mycol. Med.*, 9, 166-169
- Kim E.K., Shon D.H., Ryu D., Park J.W., Hwang H.J., Kim Y.B.**, (2000), Occurrence of aflatoxin M1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC, *Food Addit. Contam.*, 17 (1), 59-64
- Kim J.C., Kang H.J., Lee D.H., Lee Y.W., Yoshizawa T.**, (1993), Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in barley and corn in Korea, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3798-3802.
- Klich M.A.**, (2002), Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter, *Mycologia*, 94, 21-27.

- Kokkonen M., Jestoi M., Rizzo A.,** (2005), The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains, *Int. J. Food Microbiol.*, 99, 207-214.
- Kpodo K., Thrane U., Hald B.,** (2000), Fusaria and fumonisins in maize from Ghana and their co-occurrence with aflatoxins, *Int. J. Food Microbiol.*, 61 (33), 147-157
- Krysinska-Traczyk E., Kiecana I., Perkowski J., Dutkiewicz J.,** (2001), Levels of fungi and mycotoxins in samples of grain and grain dust collected on farms in Eastern Poland, *Ann. Agric. Environ. Med.*, 8 (2), 269-274
- Krysinska-Traczyk E., Perkowski J., Dutkiewicz J.,** (2007), Levels of fungi and mycotoxins in the samples of grain and grain dust collected from five various cereal crops in eastern Poland, *Ann. Agric. Environ. Med.*, 14, 159-167.
- Kure C.F., Skaar I.,** (2001), Mould contaminants in Jarlsberg and Norwegian cheese blocks from four factories, *Int. J. Food Microbiol.*, 62 (1-2), 133-137
- Kwon Chung K.J., Bennett J.E.,** (1992), Medical mycology, Lea and Febiger, London,
- Labuda R., Tancinová D.,** (2006), Fungi recovered from Slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenicity, *Ann. Agric. Environ. Med.*, 13 (2), 193-200
- Langseth W., Rudberget T.,** (1999), The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals, *Mycopathologia*, 147 (3), 157-165
- Lasram S., Bellí N., Chebil S., Nahla Z., Ahmed M., Sanchis V., Ghorbel A.,** (2007), Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard, *Int J Food Microbiol.*, 114 (3), 376-379
- Le Bars J.,** (1988), "Toxicogenesis as a function of the ecological conditions of the grain/microorganisms system. In "Preservation and storage of grains, seeds and their by products", J.L.MULTON, Lavoisier pub. New-York, Paris, 347-366.
- Le Bars J., Le Bars P.,** (1998), Strategy for safe use of fungi and fungal derivatives in food processing, *Rev. Med. Vet.*, 149, 493-500.
- Le Bars J.,** (1979), Cyclopiazonic acid production by *Penicillium camemberti* Thom and natural occurrence of this mycotoxin in cheese, *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 1052-1055.
- Lea T., Steien K., Stormer C.,** (1989), Mechanism of ochratoxin A induced immunosuppression, *Mycopathologia*, 107, 153-159
- Lebepe-Mazur S., Bal H., Hopmans E., Murphy P., Hendrich S.,** (1995), Fumonisin B₁ is fetotoxic in rats, *Vet. Hum. Toxicol.*, 37, 126-130.
- Lewis L., Onsongo M., Njapau H., Schurz-Rogers H., Luber G., Kieszak S., Nyamongo J , Backer L , Dahiye A D , Misore A , De Cock K, Rubin C.,** (2005), Aflatoxin Contamination of Commercial Maize Products during an Outbreak of Acute Aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya, *Environ. Health Perspectives*, 113, 1763-1767

Li F.Q., Li Y.W., Luo X.Y., Yoshizawa T.,(2002), *Fusarium* toxins in wheat from an area in Henan Province, PR China, with a previous human red mould intoxication episode, *Food Addit Contam.*, 19 (2), 163-167

Li S., Ouyang Y.L., Dong W., Pestka J.J., (1997), Superinduction of IL-2 gene expression by vomitoxin (deoxynivalenol) involves increased mRNA stability, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 147 (2), 331-42.

Li S., Ouyang Y., Yang G.H., Pestka J.J., (2000), Modulation of transcription factor AP-1 activity in murine EL-4 thymoma cells by vomitoxin (deoxynivalenol), *Toxicol Appl Pharmacol.*, 163 (1), 17-25.

Lorens A., Mateo R., Mateo J.J., Jimenez M., (2002), Comparison of extraction and clean-up procedures for analysis of zearalenone in corn, rice and wheat grains by high-performance liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection, *Food Addit. Contam.*, 19 (3), 272-281

Lopez-Diaz T.M., Santos J.A., Garcia-Lopez M.L., Otero A., (2001), Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenity of *Penicillium* isolates, *Int.J., Food Microbiol.*, 68, 69-74

Luchese R.H., Harrigan W.F., (1993), Biosynthesis of aflatoxin – the role of nutritional factors, *J. Appl. Bacteriol.*, 74, 5-14

Lugauskas A., Raila A., Railiene M., Raudoniene V., (2006), Toxic micromycetes in grain raw material during its processing, *Ann. Agric. Environ. Med.*, 13, 147–161

Lugauskas A., Repeckiene J., Novosinskas H., (2005), Micromycetes, producers of toxins, detected on stored vegetables, *Ann. Agric. Environ. Med.*, 12, 253–260

Luo Y., Yoshizawa T., Katayama T., (1990), Comparative study on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in corn and wheat from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 (12), 3723-3726

Luster M.I., Germolec D.R., Burleson G.R., Jameson C.W., Ackermann M.F., Lamm K.R., Hayes H.T., (1987), Selective immunosuppressions in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A, *Cancer Res.*, 47, 2259-2263

Mac Donald S., Sharman M., Castle L., Gilbert J., (1993), Ochratoxin A in foodstuffs and human plasma” in *Occurrence and significance of mycotoxins*, Scudamore ed., Central Laboratory MAFF, U.K., 208-213.

MacDonald S., Prickett P.J, Wildey K.B., Chan D., (2004), Survey of ochratoxin A and deoxynivalenol in stored grains from the 1999 harvest in the UK, *Food Addit. Contam.*, 21 (2), 172-181

Magan N., Aldred D., (2005), Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities, *Food Addit. Contam.* 22, 1-10.

Maghraby O.M., Abdel-Sater M.A., (1993), Mycoflora and natural occurrence of mycotoxins in tobacco from cigarettes in Egypt, *Zentral. Mikrobiol*, 148, 253-264.

Magnoli C., Dalcero A.M., Chiacchiera S.M., Miazzo R., Saenz M.A., (1998), Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina, *Mycopathologia*, 142 (1), 27-32

Magnoli C., Hallak C., Astoreca A., Ponsone L., Chiacchiera S.M., Palacio G., Dalcero A., (2005), Surveillance of toxigenic fungi and ochratoxin a in feedstuffs from Córdoba province, Argentina, *Vet. Res. Commun.*, 29 (5), 431-445

Majerus P., Cutko I., Dreyer A., El-Dessouki S., Eyrich W., Reusch H., Schurer B., Waiblinger H.U., (1993), Zur Belastungssituation von Ochratoxin A, in *Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs*, Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 89, 112-113.

Malone B.R., Humphrey C.W., Romer T.R., Richard J.L., (1998), One-step solid-phase extraction cleanup and fluorometric analysis of deoxynivalenol in grains, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 81 (2), 448-452

Mankeviciene A., Butkute B., Dabkevicius Z., and Suproniene S., (2007), *Fusarium* mycotoxins in lithuanian cereals from the 2004-2005 harvests, *Ann. Agric. Environ. Med.* 14, 103-107

Marijanovic D.R., Holt P., Norred W.P., Bacon C.W., Voss K.A., Stancel P.C., (1991), Immunosuppressive effects of *Fusarium moniliforme* corn cultures in chickens, *Poultry Sci.*, 70, 1895-1901

Marpegan M.R., Perfumo C.J., Godoy H.M., Sala de Miguel M., Diaz E., Risso M.A., (1988), Feed refusal of pigs caused by *Fusarium* mycotoxins in Argentina, *J. Vet. Med.*, A, 35, 610-616

Marquardt R.R., Frohlich A.A., (1992), A review of recent advances in understanding ochratoxicosis, *J. Anim. Sci.*, 70, 3968-3988

Martinova E.A., Merrill A.H. Jr, (1995), Fumonisin B₁ alters sphingolipid metabolism and immune function in BALB/c mice, *Mycopathologia*, 130, 163-170.

Martins M.L., Martins H.M., (2000), Aflatoxin M1 in raw and ultra high temperature-treated milk commercialized in Portugal, *Food Addit. Contam.*, 17 (10), 871-874

Martins M.L., Martins H.M., (2001), Determination of deoxynivalenol in wheat-based breakfast cereals marketed in Portugal, *J Food Prot.*, 64 (11), 1848-1850.

Martins M.L., Martins H.M., (2002), Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn in (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*, *Food Chem.*, Article in press.

Martins M.L., Martins H.M., Gimeno A., (2003), Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*), *Food Addit Contam.*, 20 (12), 1127-1131

Martins M.L., Martins H.M., (2004), Aflatoxin M1 in yoghurts in Portugal, *Int J Food Microbiol.*, 91 (3), 315-317

- Martins H.M., Mendes Guerra M.M., D'Almeida Bernardo F.M.,** (2007), Occurrence of Aflatoxin B1 in diary cow feeds over 10 years in Portugal (1995-2004). *Rev. Iberom. Micol.* 24, 69-71.
- Mateo J.J., Mateo R., Hinojo M.J., Llorens A., Jimenes M.,** (2002), Liquid chromatographic determination of toxigenic secondary metabolites produced by *Fusarium* strains, *J. Chromatogr. A*, 955 (2), 245 - 256.
- Mc Kean C., Tang L., Billam M., Wang Z., Theodorakis C.W., Kendall, R.J., Wand J.S.,** (2006), Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in animals and human cells, *Food Chemical Toxicology* , 44, 868-876.
- Medina A., Jiménez M., Gimeno-Adelantado J.V., Valle-Algarra F.M., Mateo R.,** (2005), Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent, *J Chromatogr A.*, 1083(1-2), 7-13.
- 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* , *Int J Food Microbiol*, 108 (2), 196-203
- Medina-Martinez M.S., Martinez A.J.,** (2000), Mold occurrence and aflatoxin B (1) and Fumonisin B (1) determination in corn samples in Venezuela, *J. Agric. Food Chem.*, 47 (7), 2833-2836
- Merrill AH, Schroeder JJ,** (1993), Lipid modulation of cell function, *Annu. Rev. Nutr.*, 13, 539-559
- Miller, J.D.,** (2002), Aspects of the ecology of *Fusarium* toxins in cereals, *Adv. Exp. Med. Biol.* 504, 19-27
- Minervini F., Giannoccaro A., Fornelli F., Dei'Aquila M.E., Minoia P., Visconti A.,** (2006), Influence of mycotoxin zearalenone and its derivatives (alpha and beta zearalenol) on apoptosis and proliferation of cultured granulosa cells from equine ovaries reproductive, *Biol. Endocrinology*, 4 (62), 1-9
- 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, *J. Food Prot*, 51, 449-451
- Mizakova A., Pipova M., Turek P.** (2002), The occurrence of moulds in fermented raw meat products, *Czech J. Food Sci*, 20, 89-94.
- Molto G.A., Gonzales H.H., Resnik S.L., Pereyra Gonzales A.,** (1997), Production of trichothecenes and zearalenone by isolates of *Fusarium* spp. From Argentinian maize, *Food Addit. Contam.*, 14 (3), 263-268
- Montagna M.I., Santacroce M.P., Spilotros G., Napoli C., Minervini F., Papa A., Dragoni I.,** (2004), Investigation of fungal contamination in sheep and goat cheeses in southern Italy, *Mycopathologia*, 158 (2), 245-249

Morales H., Marin S., Rovira A., Ramos A.J., Sanchis V., (2007), Patulin accumulation in apples by *Penicillium expansum* during postharvest stages, *Lett. Appl. Microbiol.*, 44, 30-35.

Morales-Rodriguez I., Yanez-Morales M de J., Silva-Rojas H.V., Garcia de Los Santos G., Guzman de Pena D.A., (2007) Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico associated with ear rot in maize and their identification using a phylogenetic approach, *Mycopathologia*, 163, 31-39.

Moreno-Contreras M.C., Martinez-Yepey A.J., Raybaudi-Martinez R., (2000), Determinacion de deoxinivalenol (DON) en trigo, cebada y maiz y su relacion con los niveles de mohos totales, *Fusarium* spp., porcentahe de colonizacion y actividad de agua, *Arch. Latinoam. Nutr.*, 50, 183-186

Morin O., (1994), *Aspergillus* et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques Encyl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), *Maladies infectieuses* 8-600-A-10

Muller H.M., Reiman J., Schumacher U., Schwadorf K., (2001), Further survey of the occurrence of *Fusarium* toxins in wheat grown in southwest Germany, *Arch Tierenahr*, 54 (2), 173-182

Nakajima M., Tabata S., Akiyama H., Itoh Y., Tanaka T., Sunagawa H., Tyonan T., Yoshizawa T., Kumagai S., (2004), Occurrence of aflatoxin M1 in domestic milk in Japan during the winter season, *Food Addit. Contam.*, 21(5), 472-478

Nelson P.E., Plattner R.D., Shackelford D.D., Desjardins A.E., (1992), Fumonisin B1 production by *Fusarium* species other than *F moniliforme* in section *Liseola* and by some related species, *Appl. Environ. Microbiol*, 58, 986-989.

Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O., (1983), *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania state Univ. editor

Nepote M.C., Piontelli E., Saubois A., (1997), Occurrence of *Aspergillus flavus* strains in corn from Santa Fe, Argentina, *Arch. Latinoam. Nutr.*, 47 (3), 262-264

Ngundi M.M., Shriver-Lake L.C., Moore M.H., Ligler F.S., Taitt C.R., (2006), Multiplexed detection of mycotoxins in foods with a regenerable array, *J Food Prot.*, 69 (12), 3047-3051

Niessen L., (2007), PCR based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi, *Int. J. Food Microbiol.*

Norred W., Plattner R.D., Vesonder R.F., Bacon C.W., Voss K.A., (1992), Effect of selected secondary metabolites of *Fusarium moniliforme* on unscheduled synthesis of DNA by rat primary hepatocytes, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 233-237

Nunez F., Rodriguez M.M., Bermudez M.E., Cordoba J.J., Asensio M.A., (1996), Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured Iberian ham, *Int. J., Food Microbiol.*, 32 (1-2), 185-197

- Odhav B., Naicker V.**, (2002), Mycotoxins in South African traditionally brewed beers, *Food Addit. Contam.*, 19 (1), 55-61
- Oliveira C.A., Rosmaninho J., Rosim R.**, (2006b), Aflatoxin M1 and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in São Paulo, Brazil, *Food Addit Contam.*, 23 (2), 196-201
- Oliveira G.R., Ribeiro J.M., Fraga M.E., Cavaglieri L.R., Direito G.M., Keller K.M., Dalcero A.M., Rosa C.A.**, (2006a), Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil, *Mycopathologia*, 162 (5), 355-362
- Olsen M., Mirocha C.J., Abbas H.K., Johansson E.**, (1986), Metabolism of high concentrations of dietary zearalenone by young male turkey poults, *Poult. Sci.*, 65, 1905-1910.
- 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
- Oruc H.H., Sonal S.**, (2001), Determination of aflatoxin M1 levels in cheese and milk consumed in Bursa, Turkey, *Vet. Hum. Toxicol.*, 43 (5), 292-293
- Oswald I.P., Comera C.**, (1998), Immunotoxicity of mycotoxins, *Rev. Med., Vet.*, 149, 585-590
- Osweler G.D., Kehrli M.E., Stabel J.R., Thurston J.R., Ross P.F., Wilson T.M.**, (1993), Effects of fumonisin-contaminated corn screenings on growth and health of feeder calves, *J. Anim. Sci.*, 71, 459-466
- Osweler G.D., Ross P.F., Wilson T.M., Nelson P.E., Witte S.T., Carson T.L., Rice L.G., Nelson H.A.**, (1992), Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screenings, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4, 53-59
- Ouyang I.L., Azcona-Olivera J.I., Murtha J., Pestka J.J.**, (1996), Vomitoxin mediated Il-2, Il-4 and Il-5 superinduction in murine CD4+ T cells stimulated with phorbol ester and calcium ionophore: relation to kinetics of proliferation, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 147, 331-342
- Pacin A.M., Gonzalez H.H., Etcheverry M., Restnik S.L., Vivas L., Espin S.**, (2003), Fungi associated with food and feed commodities from Ecuador, *Mycopathologia* 156, 87-92.
- Pan D., Bonsignore F., Rivas F., Perera G., Bettucci L.**, (2007), Deoxynivalenol in barley samples from Uruguay, *Int J Food Microbiol.*, 114 (2), 149-152
- Park J.J., Smalley E.B., Chu F.S.**, (1996), Natural Occurrence of *Fusarium* Mycotoxins in Field Samples from the 1992 Wisconsin Corn Crop, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 (5), 1642-1648
- Park J.W., Choi S.Y., Hwang H.J., Kim Y.B.**, (2005), Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans, *Int. J. Food Microbiol.*, 103 (3), 305-314

- Paterson P.J., Seaton S., McLaughlin J., Kibbler C.C.**, (2003), Development of molecular methods for the identification of *Aspergillus* and emerging moulds in paraffin wax embedded tissue sections, *J. Clin. Pathol.*, 56, 368-370
- Peitri A. , Bertuzzi T. , Bertuzzi P. Piva G.**, (1997), Aflatoxin M1 occurrence in samples of Grana Padano cheese, *Food Addit. Contam.*, 14 (4), 341-344
- Pena A. , Cerejo F. , Lino C. , Silveira I.**, (2005), Determination of ochratoxin A in Portuguese rice samples by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Anal Bioanal Chem.*, 382 (5), 1288-1293
- Perkowski J.**, (1998), Distribution of deoxynivalenol in barley kernels infected by *Fusarium*, *Nahrung*, 42 (2), 81-83
- Perkowski J. , Basiński T.**, (2002), Natural contamination of oat with group A trichothecene mycotoxins in Poland, *Food Addit Contam.*, 19 (5), 478-482
- Perkowski J. , Kiecana I. , Stachowiak J. , Basiński T.**, (2003), Natural occurrence of scirpentriol in cereals infected by *Fusarium* species, *Food Addit Contam.*, 20 (6), 572-578
- Pestka J.J., Bondy G.S.**, (1994), Immunotoxic effects of mycotoxins, in Miller J.D., Trenholm H.D., eds. “*Mycotoxins in grain*”, Eagon Press, Minnesota, 339-358
- Peterson S.W.**, (2006), Multilocus sequence analysis of *Penicillium* and *Europicillium* species, *Rev. Iberoam Micol.*, 23(3), 134-8.
- Pfohl-Leszkowicz A.**, (2001), Définition et origines des mycotoxines in *Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque*, Ed. Tec & Doc, 3-14
- Philipp S., Pedersen P.D.**, (1988), Mould cultures for the food industry, *Dan. Dairy Food Ind.*, 6, 10-12.
- Pier A.C., Varman M.J., Dahlgren R.R., Belden E.L., Maki L.R.**, (1986), Aflatoxic suppression of cell-mediated immune response and interactions with T-2 toxin, in : *Mycotoxins and Phycotoxins*, Steyn, P.S. and Vleggar, R., eds, Elsevier, Amsterdam, pp 423-427.
- Pietri A., T. Bertuzzi L. Pallaroni, G. Piva.** (2004), Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in northern Italy, *Food Addit. Contam.*, 21, 479-487.
- Pitt J.I.**, (1988), Laboratory guide to common *Penicillium* species, Academia Press editor, London
- Pitt J.I.**, (2000), Toxigenic fungi and mycotoxins, *Br. Med. Bull.*, 56 (1), 184 - 192.
- Placinta C.M., D’Mello J.P.F., MacDonald A.M.C.**, 1999, A review of worldwide contamination of gereal grain and animal feed with *Fusarium* mycotoxins, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 78, 21-37
- Pohland A.E., Nesheim S., Friedman L.**, (1992), Ochratoxin A, a review, *Pure, Appl. Chem.*, 64, 1029-1046

- Rainey M.R., Tubbs R.C., Hardin D.K., Cox N.M.**, (1991), Clinical manifestations of prepubertal exposure to zearalenone *In : gilts, Agri-practice*, 12, 35-41.
- Ramirez M., Chulze S., Magan N.**, (2006), Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two argentinian strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain, *Int. J. Food Microbiol.*, 106, 291-296
- Raper K., Fennell D.J.**, (1965), The genus *Aspergillus*", Williams and Wilkins editors, Baltimore
- Rasmussen P.H., Ghorbani F., Berg T.**, (2003), Deoxynivalenol and other *Fusarium* toxins in wheat and rye flours on the Danish market, *Food Addit Contam.*, 20 (4), 396-404
- Reiss E., Tanaka K., Bruker G., Chazalet V., Coleman D., Debeaupuis J.P., Hanazawa R., Latgé J.P., Lortholary J., Makimura K., Morrison C.J., Murayama S.Y., Naoe S., Paris S., Sarfati J., Shibuya K., Sullivan D., Uchida K., Yamaguchi H.**, (1998), Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections, 36 (1), 249-257
- Ribelin W.E., Fukushima K., Still P.**, (1978), The toxicity of ochratoxin A to ruminants Canadian *J. Comp. Med.*, 42, 172-176.
- Robledo M.L., Marin S., Ramos A.J.**, (2001), Contamination natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el Estado Nayarit (Mexico), *Rev. Iberoam. Micol.*, 18, 141-144
- Rodríguez M., Nunez F., Córdoba J.J., Bermudez M.E., Asensio M.A.**, (1998), Evaluation of proteolytic activity of micro-organisms isolated from dry cured ham, *J Appl. Microbiol.*, 85, 905-912.
- Rodríguez Velasco M.L., Calonge Delso M.M., Ordóñez Escudero D.**, (2003), ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M(1) in raw cow's milk, *Food Addit. Contam.*, 20 (3), 276-280
- Rojas F.J., Jodral M., Gosalvez F., Pozo R.**, (1991), Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish dry-cured ham. *Int. J. Food Microbiol.*, 13, 249-256.
- 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
- Rosa C.A.R., Ribeiro J.M.M., Fraga M.J., Gatti M., Cavaglieri L.R., Magnoli C.E., Dalcero A.M., Lopes C.W.G.**, (2006), Mycoflora of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species, *Vet Microbiol.*, 113(1-2), 89-96
- Rosenberg E., Krska R., Wissiack R., Kmetov V., Josephs R., Razzazi E., Grasserbauer M.**, 1998, „High-performance liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry as a new tool for the determination of the mycotoxin zearalenone in food and feed", *J. Chromatogr. A*, 81 (1-2), 277-288
- Rosenthal E., Marty P., Ferrero C., le Fichoux Y., Cassuto J.P.**, (2000), Infection à *Penicillium marneffei* chez un patient infecté par le HIV, *Presse Med.*, 29, 363-364

Ross P.F., Ledet A.E., Owens D.L., Rice L.G., Nelson H.A., Osweiler G.D., Wilson T.M., (1993), Experimental equine leukoencephalomalacia, toxic hepatosis, and encephalopathy caused by corn naturally contaminated with fumonisins, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5, 69-74.

Ross P.F., Rice L.G., Osweiler G.D., Nelson P.E., Richard J.L., Wilson T.M., (1992), A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates, *Mycopathologia*, 117, 109-114.

Rotter B.A., Thompson B.K., Prelusky D.B., Trenholm H.L., Stewart B., Miller J.D., Savard M.E., (1996), Response of growing swine to pure dietary fumonisin B₁ during an 8 week period: growth and clinical parameters, *Nat. Toxins*, 4, 42-50.

Roussi V., Govaris A., Varagouli A., Botsoglou N.A., (2002), Occurrence of aflatoxin M(1) in raw and market milk commercialized in Greece, *Food Addit Contam.*, 19 (9), 863-868

Royer D., Humpasf H.U., Guy P.A., (2004), Quantitative analysis of *Fusarium* mycotoxins in maize using accelerated solvent extraction before liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass-spectrometry, *Food Addit. Contam.*, 21 (7), 678-692

Sangare-Tigori B., Dem A.A., Kouadio H.J., Betbeder A.M., Dano D.S., Moukha S., Creppy E.E., (2006), Preliminary survey of ochratoxin A in millet, maize, rice and peanuts in Côte d'Ivoire from 1998 to 2002, *Hum Exp Toxicol.*, 25 (4), 211-216

Schabereiter-Gurtner C., Selitsch B., Rotter M.L., Hirschl A.M., Willinger B., (2007), Development of Novel Real-Time PCR Assays for Detection and Differentiation of Eleven Medically Important *Aspergillus* and *Candida* Species in Clinical Specimens, *J. Clin. Microbiol.*, 45 (3), 906-914

Schollenberger M., Müller H.M., Rüfle M., Suchy S., Planck S., Drochner W., (2005), Survey of *Fusarium* toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany, *Int. J. Food Microbiol.*, 97 (3), 317-326

Schollenberger M., Müller H.M., Rüfle M., Suchy S., Plank S., Drochner W., (2006), Natural occurrence of 16 *Fusarium* toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany, *Mycopathologia*, 161 (1), 43-52

Schollenberger M., Müller H.M., Rüfle M., Terry-Jara H., Suchy S., Plank S., Drochner W., (2007), Natural occurrence of *Fusarium* toxins in soy food marketed in Germany, *Int J Food Microbiol.*, 113 (2), 142-146

Schothorst, R.C., Van Egmond H.P., (2004), Report from SCOOP task 3.2.10 "collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the EU member states, Subtask: trichothecenes, *Toxicol. Lett.*, 153, 133-143.

Scott P.M., Kanhere S.R., Tarter E.J., (1986), Determination of nivalenol and deoxynivalenol in cereals by electron capture gas chromatography, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69 (5), 889-893.

Scudamore K.A., Nawaz S., Hetmanski M.T., (1998a), Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II. Determination of mycotoxins in maize and maize products, *Food Addit. Contam.*, 15 (1), 30-55

- Scudamore K.A., Nawaz S., Hetmanski M.T., Rainbird S.C.,** (1998b), Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: III. Determination of mycotoxins in rice bran, *Food Addit. Contam.*, 15 (2), 185-194
- Scudamore K.A., Patel S.,** (2000), Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom, *Food Addit. Contam.*, 17 (5), 407-416
- Sedova I.B., Tutelyian V.A.,** (2006), Study of fumonisins B1 and B2 contamination of baby food, *Vopr Pitan.*, 75 (6), 67-71.
- Serafini M., Foddai S., Pieretti S., Tomasini L., Nicoletti M.,** (1991), Effect of ochratoxin A on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*, *Can. J. Bot.*, 69, 16-17
- Serra R., Mendonca C., Venancio A.,** (2006), Ochratoxin A occurrence and formation in Portuguese wine grapes at various stages of maturation, *Int J Food Microbiol.*, 111 (1), 35-39
- Siame B.A., Mpuchane S.F., Gashe B.A., Allotey J., Teffera G.,** (1998), Occurrence of aflatoxins, fumonisin B1 and zearalenone in foods and feeds in Botswana, *J. Food Prot.*, 61 (12), 1670-1673
- Singh G.S., Chauhan H.V., Jha G.J., Singh K.K.,** (1990), Immunosuppression due to chronic ochratoxicosis in broiler chicks, *Pathol*, 103, 399-410
- Smith J.F., di Menna M.E., McGowan L.T.,** (1990), Reproductive performance of Coopworth ewes following oral doses of zearalenone before and after mating, *J. Reprod. Fert.*, 89, 99-106.
- Smith J.F., Wesselink C., Parr J., Sprosen J.M., Fowke E.A., Towers N.R., Laboyrie N.R.,** (1995), Effect of zearalenone on ewe pregnancy rates In Garthwaite, L., ed, Toxinology and food safety research report 1992-1995 AgResearch : Hamilton, New Zealand, 41-43.
- Sobek E.A.,** (1996), Association between corn insects and symptomatic and asymptomatic corn kernel infection by *Fusarium moniliforme*, MS Thesis, Iowa State University, Ames
- Sohn H.B., Seo J.A., Lee Y.W.,** (1999), Co-occurrence of *Fusarium* mycotoxins in mouldy and healthy corn from Korea, *Food Addit. Contam.*, 16 (4), 153-158
- Solovey M.M., Somoza C., Cano G., Pacin A., Resnik S.,** (1999), A survey of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins contamination in corn-based food products in Argentina, *Food Addit. Contam.*, 16 (8), 325-329
- Srinjar M., Dimic G.,** (1992), Ochratoxigenicity of *Aspergillus ochraceus* group and *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* strains on various media, *Acta Microbiol. Hung.*, 39, 257-261.
- Srivastava V.P., Bu-Abbas A, Alaa-Basuny , Al-Johar W., Al-Mufti S., Siddiqui M.K.,** (2001), "Aflatoxin M1 contamination in commercial samples of milk and dairy products in Kuwait", *Food Addit. Contam.*, 18 (11), 993-997
- Steyn P.S.,** (1980), The biosynthesis of mycotoxins: a study of secondary metabolism, *Academic Press, INC*

- Sugita-Konishi Y., Nakajima M., Tabata S., Ishikuro E., Tanaka T., Norizuki H., Itoh Y., Aoyama K., Fujita K., Kai S., Kumagai S.,** (2006), Occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, and fumonisins in retail foods in Japan, *J Food Prot.*, 69 (6), 1365-1370
- Sutton D.A., Fothergill A.W., Rinaldi M.G.,** (1998), Guide to clinically significant fungi, Baltimore, Williams and Wilkins
- Swamy H.V.L.N., Smith T.K., Cotter P.F., Boermans H.J., Sefton A.E.,** (2002a), Effects of feeding blends, of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on production and metabolism in broilers, *Poult. Sci.*, 81 (7), 966 - 975.
- Swamy H.V.L.N., Smith T.K., Mac Donald E.J.,** (2002b), Effects of feeding blends, of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on brain regional neurochemistry of starter pigs and broiler chickens, *J. Anim. Sci.*, 82, 2131-2139
- Tabahashi H., Kamimura H., Ichinoe M.,** (2004), Distribution of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in sugarcane fields in the southernmost island of Japan, *J. of Food Protection*, 67, 90-95.
- Tabuc C.,** (2007), Incidence of *Fusarium* species and of their toxins in the compound feeds for poultry, International Scientific symposium: Performances and competitiveness in animal production, 26-27 avril 2007, Iasi, Roumanie
- Tam J., Mankotia M., Mably M., Pantazopoulos P., Neil R.J., Calway P., Scott P.M.,** (2006), Survey of breakfast and infant cereals for aflatoxins B1, B2, G1 and G2, *Food Addit Contam.*, 23 (7), 693-699
- Terplan G., Wenzel S.,** (1993), Untersuchungen zum einfluss des Mykotoxins Ochratoxin A auf die Tiergesundheit und auf das Rückstandsverhalten beim Schwein und aus daraus hergestellten Wurstwaren, *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 44, 129-152.
- Thanh Ha D., Dinh Thao T., Tri Khiem N., Xuan Trieu M., Gerpacio R.V., Pingali P.L.,** (2004), Maize in Vietnam: Production Systems, Constraints, and Research Priorities. Mexico, D.F.
- Thomas P.A., Geraldine P.,** (1992), Fungal keratitis due *Fusarium* and other fungi, *J. Mycol. Med.*, 2, 121-131
- Tjamos S.E., Antoniou P.P., Tjamos E.C.,** (2006), *Aspergillus* spp., distribution, population composition and ochratoxin A production in wine producing vineyards in Greece, *Int J Food Microbiol.*, 111 (1), 61-66
- Tobias S., Rajic I., Vanyi A.,** (1992), Effect of T-2 toxin on egg production and hatchability in laying hens, *Acta Vet Hung.*, 40 (1-2), 47-54
- Towers N.R.,** (1992), Zearalenone induced infertility in sheep, Proc. 22nd Sheep and beef cattle seminar, Publication 145 veterinary continuing education, Masey university : Palmerston, New Zealand, 159-178
- Towers N.R., Sprosen J.M.,** (1992), *Fusarium* mycotoxins in pastoral farming : zearalenone induced infertility in sheep, In : *Gopalakrishnakon, P. & Tan, C.K., eds, Recent advances in toxinology research, vol 3*, Singapore, 272-284

Visconti A., Pascale M., (1998), Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J Chromatogr. A*, 815 (1), 133-140

Visconti, A., (1996), Fumonisin in maize genotypes grown in various geographic areas. *Adv. Exp. Med. Biol.* 392, 193-204.

Vrabcheva T., Gessler R., Usleber E., Martlbauer E., (1996), First survey on the natural occurrence of Fusarium mycotoxins in Bulgarian wheat, *Mycopathologia*, 136 (1), 47-52

Vrabcheva T., Usleber E., Dietrich R., Märtlbauer E., (2000), Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy, *J Agric Food Chem.*, 48 (6), 2483-2488

Vrabcheva T., Petkova-Bocharova T., Grosso F., Nikolov I., Chernozemsky I.N., Castegnaro M., Dragacci S., (2004), Analysis of ochratoxin A in foods consumed by inhabitants from an area with Balkan endemic nephropathy: a 1 month follow-up study, *J Agric Food Chem.*, 52 (8), 2404-2410

Wang D.S., Liang Y.X., Nguyen T.C., Le D.D., Tanaka T., Ueno Y., (1995), Natural co-occurrence of Fusarium toxins and aflatoxin B1 in corn for feed in north Vietnam, *Nat. Toxins*, 3 (6), 445-449

Wang J., Fitzpatrick D.W., Wilson J.R., (1998), Effects of the trichothecene mycotoxin T-2 toxin on neurotransmitters and metabolites in discrete areas of the rat brain, *Food Chem Toxicol.*, 36 (11), 947-53.

Wilson T.M., Ross P.F., Owens D.L., Rice L.G., Green S.A., Jenkins S.J., Nelson H.A., (1992), Experimental reproduction of ELEM. A study to determine the minimum toxic dose in ponies, *Mycopathologia*, 117, 115-120.

Wilson, D.M., Mubatanhema W., Jurjevic Z., (2002), Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 504, 3-17.

Wu M.T., Ayres J.C., Koehler P.E., (1974), Toxicogenic *Aspergilli* and *Penicillia* isolated from aged cured meats, *Applied Microbiol.*, 28, 1094-1096.

Yamamura H., Kobayashi T., Ryu J.C., Ueno Y., Nakamura K., Izumiyama N., Ohtsubo K., (1989), Subchronic feeding studies with nivalenol in C57BL/6 mice, *Food Chem Toxicol.*, 27 (9), 585-90.

Yamashita, A., Yoshizawa, T., Aiura, Y., Sanchez, P.C., Dizon, E.I., Arim, R.H., Sardjono, S., (1995), *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, nivalenol, and zearalenone) and aflatoxins in corn from Southeast Asia. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry* 59, 1804-1807.

Yang J., Zhang Y., Wang Y., Cui S., (2006), Toxic effects of zearalenone and α -zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells, *Toxicol. In vitro*, Article in Press

- Tran Sy Tung, Bailly J.D., Querin A., Le Bars P., Guerre P.,** (2001), Fungal contamination of rice from south Vietnam, mycotoxinogenesis of selected strains and residues in rice, *Rev. Méd. Vét.*, 152, 7, 555-560
- Trenholm H.L., Prelusky D.B., Young J.C., Miller J.D.,** (1988), Reducing Mycotoxins in Animal Feeds, *Agriculture Canada*, A63, 1827-1988
- Trucksess M.W., Nesheim S., Eppley R.M.,** (1984), Thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat and corn, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67 (1), 40-43.
- Trucksess M.W., Flood M.T., Mossoba M.M., Page S.W.,** (1987), High performance thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol, fusarenon X, nivalenol in barley, corn and wheat, *J. Agric. Food Chemistry*, 35 (4) , 445 - 448.
- Trucksess M.W., Giler J., Young K., Whitw K.D., Page S.W.,** (1999), Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee, *J.A.O.A.C.*, 82 (1), 85-89
- Tutelyan V.A.,** (2004), Deoxynivalenol in cereals in Russia, *Toxicol. Lett.*, 153, 173-179
- Uhlig S., Torp M., Jarp J., Parich A., Gutleb A.C., Krska R.,** (2004), Moniliformin in Norwegian grain, *Food Addit Contam.*, 21 (6), 598-606
- Unusan N.,** (2006), Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey, *Food Chem. Toxicol.*, 44 (11), 1897-1900
- Urbano G.R., Taniwaki M.H., Leitão M.F., Vicentini M.C.,** (2001), Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee, *J Food Prot.*, 64 (8), 1226-1230
- Usleber E., Abramson D., Gessler R., Smith D.M., Clear R.M., Märtilbauer E.,** (1996), Natural Contamination of Manitoba Barley by 3, 15-Diacetyldeoxynivalenol and Its Detection by Immunochromatography, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 (10), 3858-3860
- Vainio H., Magee P., McGregor D., McMichael A.,** (1992), Mechanisms of Carcinogens in Risk Identification, IARC Scientific Publications No 116, IARC, Lyon.
- Varga J., Kevei E., Rimony E., Teren J., Kazakiewicz Z.,** (1996), Ochratoxin production by *Aspergillus* species, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4461-4464
- Vargas E.A., Preis R.A., Castro L., Silva C.M.,** (2001), Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, G2, zearalenone and fumonisin B1 in Brazilian corn, *Food Addit. Contam.*, 18 (11), 981-986
- Velluti A., Marin S., Bettucci L., Ramos A.J., Sanchis V.,** (2000), The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B1 and zearalenone formation, *Int. J., Food Microbiol.*, 59, 59-66
- Vesely D., Vesela D., Jelinek R.,** (1983), Comparative assessment of the aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ and M1 embryotoxicity in the chick embryo, *Toxico. Letters*, 15, 297-302.
- Vidal D.R.,** (1990), Propriétés immunosuppressives des mycotoxines du groupe des trichotécènes, *Bull. Inst. Pasteur*, 88, 159-192.

Yoshizawa T., Yamashita A., Luo Y., (1994), Fumonisin occurrence in corn from high and low areas from esophageal cancer in China, *Applied Environ. Microbiol.*, 60, 1626-1629.

Yoshizawa T., Yamashita A., Chokethaworn N., (1996), Occurrence of fumonisins and aflatoxins in corn from Thailand, *Food Addit Contam.*, 13 (2), 163-168

Yoshizawa T., (2001), Chromatographic methods for trichothecenes, *Methods Mol. Biol.*, 157, 115 – 129.

Young LG, Ping H, King GJ., (1990), Effects of feeding zearalenone to sows on rebreeding and pregnancy, *J. Anim. Sci.*, 68, 15-20

Yuwai KE, Rao KL, Singh K, Tanaka T, Ueno Y., (1994), Occurrence of nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in imported cereals in Papua, New Guinea., *Nat. Toxins*, 2, 19-21.

Zhou HR, Yan D, Pestka JJ., (1998), Induction of cytokine gene expression in mice after repeated and subchronic oral exposure to vomitoxin (Deoxynivalenol): differential toxin-induced hyporesponsiveness and recovery, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 151 (2), 347-58.

Zimmerli B, Dick R., (1996), Ochratoxin A in table wine and grape juice : occurrence and risk assessment, *Food Addit. Contam.*, 13, 655-668.

Zinedine A, González-Osnaya L, Soriano JM, Moltó JC, Idrissi L, Mañes J., (2007a), Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco, *Int J Food Microbiol.*, 114 (1), 25-29

Zinedine A, Soriano JM, Juan C, Mojemmi B, Moltó JC, Bouklouze A, Cherrah Y, Idrissi L, El Aouad R, Mañes J., (2007b), Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits from Rabat and Salé area, Morocco, *Food Addit Contam.*, 24 (3), 285-291

Zinedine A., Soriano M.J., Molto J.C., Mañes J., 2007c, “Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin”, *Food Chem. Toxicol.*, 45, 1-18

Zummo N, Scott GE., (1992), Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on kernel infection and aflatoxin contamination in maize ears, *Plant. Dis.*, 76, 771-773