



HAL
open science

Caractérisation de la biodiversité des souches d'*Aspergillus* de la section *Flavi* isolées d'aliments commercialisés au Liban : approche moléculaire, métabolique et morphologique

Joya Makhoulouf

► To cite this version:

Joya Makhoulouf. Caractérisation de la biodiversité des souches d'*Aspergillus* de la section *Flavi* isolées d'aliments commercialisés au Liban : approche moléculaire, métabolique et morphologique. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT; Université Libanaise, 2019. Français. NNT : 2019INPT0049 . tel-04166959

HAL Id: tel-04166959

<https://theses.hal.science/tel-04166959>

Submitted on 20 Jul 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme JOYA MAKHLOUF

le jeudi 11 juillet 2019

Titre :

Caractérisation de la biodiversité des souches d'*Aspergillus* de la section Flavi isolées d'aliments commercialisés au Liban: approche moléculaire, métabolique et morphologique

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Toxicologie Alimentaire (ToxAlim)

Directeur(s) de Thèse :

M. JEAN-DENIS BAILLY

M. MONZER HAMZE

Rapporteurs :

M. JEROME MOUNIER, UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mme MIREILLE KALASSY AOUD, UNIVERSITE ST JOSEPH DE BEYROUTH

Membre(s) du jury :

M. ZIAD DAOUD, UNIVERSITE DE BALAMAND, Président

M. JEAN-DENIS BAILLY, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

M. MONZER HAMZE, UNIVERSITE LIBANAISE, Membre

M. OLIVIER PUEL, INRA TOULOUSE, Membre

TABLE DES MATIERES

Liste des TABLEAUX.....	5
Liste des FIGURES.....	6
Liste des ABRÉVIATIONS.....	7
INTRODUCTION.....	9
Première Partie : DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES.....	11
1. LES MOISSURES ET LES MYCOTOXINES : GÉNÉRALITÉS	11
1.1. Les moisissures : des microorganismes utiles ou nuisibles	11
1.2. Identification et classification des moisissures	13
1.2.1. <i>Identification des moisissures</i>	13
i) identification morphologique	
ii) identification moléculaire	
1.2.2. <i>Classification des moisissures</i>	22
1.3. Les mycotoxines	26
1.3.1. <i>Origine et biosynthèse</i>	26
1.3.2. <i>Conditions de toxinogénèse</i>	26
i) facteurs biotiques	
ii) facteurs abiotiques	
1.3.3. <i>Les principales mycotoxines et leurs effets</i>	29
2. LES ASPERGILLUS DE LA SECTION FLAVI.....	33
2.1. Le genre <i>Aspergillus</i> : caractéristiques générales	33
2.2. La section Flavi.....	35
2.2.1. <i>Aspergillus flavus</i>	35
2.2.2. <i>Aspergillus parasiticus</i>	36
2.2.3. <i>Aspergillus nomius</i>	37
2.2.4. <i>Aspergillus tamarii</i>	38
2.2.5. <i>Aspergillus minisclerotigenes</i>	38
2.3. Les toxines produites par les <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	39
2.3.1. <i>Les aflatoxines</i>	39
2.3.1.1. Structures et propriétés chimiques	
2.3.1.2. Voie de biosynthèse	
2.3.1.3. Conditions nécessaires à la production des aflatoxines	
i) particularités de la souche fongique	
ii) nature du substrat	
iii) les facteurs climatiques	

iv) les autres facteurs environnementaux	
2.3.1.4. Métabolisme et toxicité des aflatoxines	
i) métabolisme	
ii) mécanisme d'action cellulaire	
iii) toxicité	
iv) réglementation	
2.3.2. <i>L'acide cyclopiazonique</i>	54
2.3.2.1. Structure et voie de biosynthèse	
2.3.2.2. Toxicité	
i) mécanisme d'action cellulaire	
ii) toxicité aiguë et subaiguë	
iii) toxicité chronique	
2.4. Chemotype des différentes espèces d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	57
3. LES ASPERGILLUS DE LA SECTION FLAVI ET LEURS TOXINES DANS LES DENRÉES ALIMENTAIRES	59
3.1. Contamination par les aflatoxines.....	60
3.1.1. <i>Les céréales</i>	60
3.1.2. <i>Fruits à coque et fruits secs</i>	62
3.1.3. <i>Les épices</i>	64
3.2. Contamination par l'acide cyclopiazonique.....	67
3.3. Contamination par les <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	68
SECONDE PARTIE : TRAVAIL EXPÉRIMENTAL.....	72
1. OBJECTIFS	72
2. MATERIEL ET MÉTHODES.....	73
2.1. Solvants et réactifs	73
2.2. Echantillonnage.....	73
2.2.1. <i>Epices</i>	73
2.2.2. <i>Céréales et fruits secs</i>	74
2.3. Numération et identification fongique	75
2.4. Caractérisation des souches d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	76
2.4.1. <i>Identification morphologique</i>	76
2.4.2. <i>Identification moléculaire</i>	78
2.4.3. <i>Détermination du potentiel toxigène des souches</i>	
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	83
3.1. Biodiversité des <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> contaminant les épices commercialisées au Liban	83
Article : <i>Morphologic, molecular and metabolic characterization of Aspergillus section Flavi in spices marketed in Lebanon, Scientific Reports, 2019</i>	84

3.2. Biodiversité des <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> contaminant les céréales commercialisées au Liban	97
3.2.1. Flore fongique totale des échantillons de céréales	97
3.2.2. Caractérisation des souches d' <i>Aspergillus</i> de la section <i>Flavi</i> isolées des échantillons de céréales	101
3.3. Biodiversité des <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> contaminant les fruits secs commercialisés au Liban.....	103
3.3.1. Flore fongique totale des échantillons de fruits secs	105
3.3.2. Caractérisation des souches d' <i>Aspergillus</i> de la section <i>Flavi</i> isolées des échantillons de fruits secs	107
4. TRAVAIL COMPLÉMENTAIRE : IMPACT DU MILIEU DE CULTURE SUR LA PRODUCTION DE SCLÉROTES ET DE MYCOTOXINES	108
4.1. Contexte	108
4.2. Protocole expérimental.....	109
4.3. Résultats et discussion.....	109
BIBLIOGRAPHIE.....	114

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Gènes recommandés pour l'identification moléculaire de différents genres fongiques.....	19
Tableau 2 : Gamme d'activité de l'eau permettant la croissance de certaines espèces des genres <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>	20
Tableau 3 : Impact de l'aw sur la croissance des espèces fongiques.....	21
Tableau 4 : Principales mycotoxines, moisissures toxigènes et principaux substrats les plus souvent contaminés	31
Tableau 5 : Organes cibles et pathologies associées aux principales mycotoxines	32
Tableau 6 : DL50 de l'AFB1 dans certaines espèces animales.....	49
Tableau 7 : Valeurs règlementaires en vigueur en UE pour les aflatoxines dans l'alimentation humaine et animale	53
Tableau 8 : Teneurs maximales en aflatoxines dans les produits destinés à l'alimentation humaine et animale au Liban (Ministère de l'agriculture 2004)	54
Tableau 9 : Capacité des différentes espèces de la section <i>Flavi</i> à produire des AFB, AFG et ACP	58
Tableau 10 : Occurrence de l'AFB1 dans le maïs des denrées alimentaires à base de maïs en Europe, Amérique, Asie de l'EST et Afrique depuis 2013... ..	61
Tableau 11 : Présence des aflatoxines dans les fruits à coque et les fruits secs.....	62
Tableau 12 : Présence des aflatoxines dans les épices.....	65
Tableau 13 : Présence et potentiel toxigène des <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> dans les aliments	69
Tableau 14 : Production d'acide aspergillique par les différentes espèces de la section <i>Flavi</i>	77
Tableau 15 : Séquences des amorces utilisées pour l'identification moléculaire des souches de la section <i>Flavi</i>	79
Tableau 16 : Flore fongique des échantillons de maïs.....	99
Tableau 17 : Flore fongique des échantillons de blé.....	100
Tableau 18 : Flore fongique des autres échantillons de céréales.....	101
Tableau 19 : Potentiel toxigène des souches d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> isolées des échantillons de céréales.....	103
Tableau 20 : Teneurs maximales en aflatoxines tolérées dans les fruits secs en Europe (règlement 1881/2006).....	105
Tableau 21 : Flore fongique des échantillons d'arachide.....	107
Tableau 22 : Aspect de la colonne d' <i>Aspergillus minisclerotigenes</i> après 14 jours de culture à 25°C en fonction du milieu de culture.....	113
Tableau 23 : Influence des conditions de culture d'une souche d' <i>Aspergillus</i> à sclérotés sur la synthèse de l'AFB1, AFG1 et ACP.....	114

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Moisissures utiles dans le processus d'affinage de certains aliments.....	12
Figure 2: Modes de formation des conidies.....	17
Figure 3: Représentation schématique de la localisation des ITS 1 et 2 sur l'ADN ribosomique.....	19
Figure 4: Les zygomycètes, les ascomycètes et les basidiomycètes.....	25
Figure 5: Prévalence de certaines mycotoxines dans les céréales produites dans le monde.....	30
Figure 6: Caractéristiques microscopiques des espèces appartenant au genre <i>Aspergillus</i>	35
Figure 7: Aspect microscopique et macroscopique d'un <i>Aspergillus flavus</i>	36
Figure 8: Aspect microscopique et macroscopique d'un <i>Aspergillus Parasiticus</i>	37
Figure 9: Aspect microscopique et macroscopique d'un <i>Aspergillus nomius</i>	37
Figure 10: Aspect microscopique et macroscopique d'un <i>Aspergillus tamarii</i>	38
Figure 11: Aspect microscopique et macroscopique d'un <i>Aspergillus minisclerotigenes</i>	39
Figure 12: Structure des 5 principales aflatoxines: AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1.....	40
Figure 13: Gènes et cascade de réactions permettant la synthèse des aflatoxines B et G.....	42
Figure 14: Pays européens ayant rapporté une contamination de leurs productions par les aflatoxines.....	45
Figure 15: Biotransformation hépatique de l'AFB1.....	46
Figure 16: Interaction de l'AFB1-8,9 époxyde avec les constituants cellulaires.....	48
Figure 17: Cluster des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ACP.....	55
Figure 18: Types des différents épices étudiés ainsi que l'endroit de leur échantillonnage.....	56
Figure 19 : Endroit d'échantillonnage du blé et des fruits secs.....	74
Figure 20: Zones de collectes des différents échantillons de céréales et fruits secs.....	75
Figure 21: Image des sclérotés sous une loupe binoculaire.....	110
Figure 22: Différence entre la taille des sclérotés synthétisés par une souche d' <i>Aspergillus minisclerotigenes</i> (J117c) et ceux d'une souche d' <i>Aspergillus flavus</i> (J7).....	111
Figure 23: La souche J117 après 14 jours de culture sur 10 milieux différents.....	112

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACP	Acide cyclopiazonique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AF	Aflatoxine
AFB	Aflatoxines type B
AFB₁	Aflatoxine B ₁
AFB₂	Aflatoxine B ₂
AFG	Aflatoxines type G
AFG₁	Aflatoxine G ₁
AFG₂	Aflatoxine G ₂
AFM₁	Aflatoxine M ₁
AFPA	<i>Aspergillus flavus parasiticus Agar</i>
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ALARA	As Low As Reasonably Achievable
ARN	Acide ribonucléique
ARN_m	Acide ribonucléique messenger
ARN_t	Acide ribonucléique de transfert
ATP	Adenosine TriPhosphate
ATPase	Adenosine Triphosphatase
A_w	Activité de l'eau
β-tub	Béta-Tubuline
CFU	Colony Forming Unit
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CMA	Corn Meal Agar
Cmd	Calmoduline
CO₂	Dioxyde de Carbone
CREA	Créatinine Sucrose Agar
CYA	Czapeck Yeast Agar
Cz	Czapeck
DALYS	Death And Disability Adjusted Life Years
DL₅₀	Dose Létale 50
DON	Deoxynévalénol
EC	European Commission
EU	European Union
FAO	Food and Agriculture Organisation

FDA	Food and Drug Administration
FeSO₄	Sulfate de Fer II
FUM	Fumonisine
GC/MS	Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
HACCP	Hazard Analysis of Critical Control Points
H₂O	Eau
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ITS	Internal Transcribed Spacer
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
KCl	Chlorure de Potassium
K₂HPO₄	Phosphate de potassium
LIBNOR	Lebanese Standards Institution
MEA	Malt Extract Agar
MgSO₄	Sulfate de Magnesium
MRS	De De Man, Rogosa et Sharpe
NaCl	Chlorure de Sodium
ND	Non Détectable
OTA	Ochratoxine A
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
pH	Potential of Hydrogen
ppb	Particules par billion
rpm	Rotations par minute
RT	Reverse Transcriptase
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
UV	Ultrat Violet
WHO	World Health Organization
ZEN	Zéaralénone

INTRODUCTION

Les moisissures sont des microorganismes pluricellulaires ubiquistes. La plupart des espèces disposent d'un potentiel enzymatique important leur permettant de coloniser de nombreux substrats et notamment des aliments (céréales, fruits secs, arachides, épices...).

Le développement de moisissures sur les denrées alimentaires peut avoir plusieurs conséquences. Cela peut améliorer les qualités organoleptiques du produit grâce à l'action des enzymes fongiques (affinage des fromages ou des produits de salaison sèche). Cependant, dans la majorité des cas, le développement de ces microorganismes entraîne une altération de l'aliment (changement de l'aspect, du goût, de l'odeur...) et peut, dans certains cas, entraîner l'accumulation de composés toxiques, les mycotoxines.

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par certaines espèces de moisissures au cours de leur développement. Il existe de très nombreuses mycotoxines, de structures variées. Parmi ces contaminants, les aflatoxines (AF), et en particulier l'AFB1, sont certainement les plus importantes pour la santé publique. En effet, l'AFB1 est la seule mycotoxine classée dans le groupe I des composés carcinogènes pour l'homme et l'animal (responsable d'hépatocarcinomes). En outre, elle semble impliquée dans les retards de croissance observés chez les enfants exposés de façon chronique dans certaines zones du monde.

L'aflatoxine B1 est produite par des espèces fongiques appartenant au genre *Aspergillus*, et plus précisément par les *Aspergillus* de la section *Flavi*. Au cours des dernières années, les progrès de la biologie moléculaire appliquée aux moisissures ont permis de montrer que cette section est complexe et comporte de nombreuses espèces qui se distinguent par des différences morphologiques subtiles ainsi que par la séquence de certains gènes mais aussi par leur profil métabolique et en particulier leur capacité à produire des mycotoxines.

A ce jour, il n'existe que peu de données sur la présence des *Aspergillus* de la section *Flavi* dans les produits agricoles commercialisés au Liban.

L'objectif de nos travaux était donc d'étudier la biodiversité des souches d'*Aspergillus* de cette section isolées à partir de différents substrats alimentaires pouvant être colonisés par des champignons tels que les épices, les céréales et les fruits secs commercialisés dans différentes régions du Liban. Pour cela, nous avons caractérisé les souches présentes en utilisant des approches : morphologique, moléculaire et métabolique.

PREMIERE PARTIE : DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

1. LES MOISSURES ET LES MYCOTOXINES : GÉNÉRALITÉS

1.1. Les moisissures : des microorganismes utiles ou nuisibles

Les moisissures représentent un groupe hétérogène de microorganismes pouvant se développer à l'état saprophyte ou parasite sur de nombreux substrats.

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 au niveau des conditions environnementales du substrat, ces champignons peuvent contaminer des milieux très divers comme les céréales, les produits d'origine animale (lait, viande) mais aussi le papier, les tissus, les matières organiques en décomposition, où ils trouvent une source de carbone et d'azote accessibles.

Le développement des moisissures sur ces produits aboutit à des modifications physiques (aspect, odeur et goût) et chimiques (Bennett *et al.*, 2003).

Ainsi, en fonction de la nature des modifications induites, on peut distinguer deux grands groupes de moisissures :

- **Les moisissures utiles** : Elles sont utilisées dans l'industrie pour conférer aux produits des propriétés organoleptiques et technologiques particulières grâce à leur potentiel enzymatique. Ces espèces sont utilisées en fromagerie : *Penicillium camemberti* qui se développe en surface de nombreux fromages dit « à croûte fleurie » et *Penicillium roqueforti* qui est utilisé pour les fromages dit « à pâte persillée ». D'autres espèces sont utilisés dans la fabrication des produits de salaison secs tels que *Penicillium jensenii* ou *nalgiovense*, qui forment le feutrage blanc de certains saucissons (Figure 1). *Aspergillus sojae* est utilisé au Japon dans la fabrication de la sauce soja et *A. oryzae* est lui largement utilisé pour la fabrication du saké. Cette espèce, tout comme d'autres espèces fongiques, est

aussi utilisée dans des processus biotechnologiques pour la synthèse de différents acides, comme l'acide citrique et l'acide gluconique, ainsi que pour la production d'enzymes (protéases, alpha-amylases, glucoamylases...) (Perry *et al.*, 2004). Ainsi, environ 22 % des antibiotiques et 40 % des enzymes produits industriellement sont élaborés par les espèces fongiques (Strohl, 1997).



Figure 1 : Moisissures utiles dans le processus d'affinage de certains aliments

A : *P. roqueforti* ; B : *P. camemberti*; C : *P. nalgiovensis*

- **Les moisissures nuisibles** : Le développement incontrôlé des moisissures peut aussi entraîner une altération des qualités organoleptiques (couleur, odeur, goût) et nutritionnelles des produits alimentaires (disparition de certains nutriments utilisés par les moisissures pour leur développement). Ainsi, on estime que le développement incontrôlé de micromycètes est à l'origine de la perte de 5 à 10% des récoltes mondiales (Filténborg *et al.*, 1996; Pitt *et al.*, 2000; Yiannikouris *et Jouany*, 2002).

De plus, lors de leur développement, les moisissures peuvent produire des métabolites secondaires toxiques pour l'homme et l'animal appelés mycotoxines (voir paragraphe 1.3).

1.2. Identification et classification des moisissures

Les champignons, sont des organismes eucaryotes uni- ou pluricellulaires, incluant des espèces macroscopiques (macromycètes) et d'autres microscopiques (micromycètes), qui deviennent visibles quand le développement est important. Elles présentent alors un aspect filamenteux ou lévuriforme.

Ces micromycètes, appelés aussi « moisissures », sont capables de coloniser de très nombreux substrats et sont ubiquistes.

Leur pouvoir contaminant est lié à leur capacité de produire un très grand nombre de spores. Ces dernières sont issues d'une reproduction sexuée ou asexuée. C'est la forme sexuée (forme parfaite, stade téléomorphe) qui est utilisée pour la classification des espèces.

1.2.1 Identification des moisissures

Afin d'évaluer le risque potentiel lié à la présence de moisissures sur un substrat, l'identification des espèces présentes est une étape primordiale. Pendant longtemps, cette identification a été uniquement basée sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques de l'espèce (Rapper *et Fennell*, 1965 ; Samson *et al.*, 2006). Les progrès de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils aidant à faire l'identification en prenant aussi en compte la séquence de certains gènes d'intérêt (White *et al.*, 1990; Girardin *et al.*, 1993; Geiser *et al.*, 2007; Peterson *et al.*, 2008; Samson *et al.*, 2014). Par ailleurs, l'analyse du potentiel métabolique d'une souche fongique peut aussi apporter des éléments importants permettant d'orienter l'identification mais aussi de mieux évaluer le risque lié à son développement (production de mycotoxines notamment).

i) Identification morphologique

Pour identifier une espèce fongique, l'analyse morphologique est indispensable. Elle repose sur des critères macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers, exsudat, production de sclérotites...) et microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores, des conidies...). (Cahagnier *et Richard-Molard*, 1998 ; Klich, 2002 ; Pitt *et Hocking*, 2009 ; Samson *et al.*, 2010). Des paramètres cultureux comme la température et la vitesse de croissance peuvent aussi être pris en compte.

- **Critères d'identification macroscopique**

Sur milieu de culture, les champignons filamenteux forment des colonies dont l'aspect peut être variable.

- Structure du thalle : Les colonies peuvent apparaître duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses ; certaines peuvent parfois avoir une apparence glabre (absence ou pauvreté du mycélium aérien).

- Le relief des colonies : Les colonies peuvent être plates ou plissées et leur consistance peut être variable (molle, friable, élastique ou dure).

- La taille des colonies : après une période d'incubation donnée, on peut observer de petites colonies (*Cladosporium*) ou au contraire, des colonies étendues, envahissantes (*Mucor*, *Rhizopus*).

- La couleur des colonies : Elle peut aider à identifier le genre fongique voire même parfois à différencier les différentes espèces au sein d'un genre. Les couleurs les plus fréquentes sont blanche, crème, jaune, orange, rouge allant jusqu'au violet ou bleue, verte ou brune allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du thalle (*mycelium*, *conidiophores*, *spores*, *cleistothèces*) ou diffuser dans le milieu de culture. La couleur du revers de la colonie peut être informative.

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

. **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.

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 :

. **Les apothécies** : l'ascocarpe est ouverte, en forme de coupe, portant les asques en surface ;

. **Les cléistothèces** : l'ascocarpe est arrondie 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*).

. **Les périthèces** : l'ascocarpe a la forme d'une bouteille, 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*).

. **Les sclérotés** : ce sont des masses mycéliennes compactes très dures globuleuses ou allongées. Ils sont considérés comme des organes de conservation (*Aspergillus* et *Penicillium*).

- **Critères d'identification microscopique :**

L'identification microscopique est réalisée grâce à un étalement entre lame et lamelle, ou bien en réalisant un scotch test. On utilise le plus souvent comme liquide de montage du bleu Coton dilué dans du lactophénol d'Amann.

Un examen, généralement réalisé 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 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 issues de la reproduction asexuée : L'examen des spores et de leur organisation est une étape importante de l'identification fongique. Elles peuvent être endogènes ou exogènes :

* Les spores endogènes (*endospores*) sont produites à l'intérieur d'un sac fermé (sporange), porté par un filament spécialisé (sporangiophore). Ces spores, que l'on observe par exemple chez les *Mucorales*, sont libérées suite à la déchirure de la paroi de sporange à maturité.

* Les spores exogènes (*conidies*), retrouvées chez les *Ascomycètes*, *Basidiomycètes* et *Deutéromycètes*, sont formées à partir d'une cellule spécialisée (cellule conidiogène).

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*).

Les spores peuvent être formées selon plusieurs modes :

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

- le type *thallique solitaire*, ex : *Chrysosporium*
- le type *thallique arthrique* (formées par fragmentation du mycélium) 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 distingue plusieurs variantes schématisées sur la figure 2 :

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

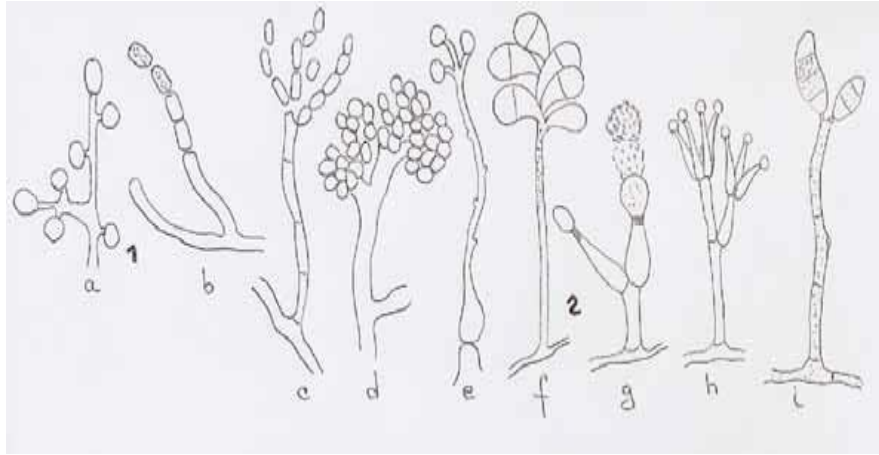


Figure 2 : Modes de formation des conidies (d'après Botton *et al.*, 1990).

1. Formation thallique : a : solitaire (*Chrysosporium*), b : arthrique (*Geotrichum*)
2. Formation blastique : c : acropète (*Cladosporium*), d : synchrone (*Botrytis*), e : sympodial (*Beauveria*), f : regressif (*Trichothecium*), g : annellidique (*Scopulariopsis*), h : phialidique (*Penicillium*), i : porique (*Curvularia*).

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 glomérules, ex : *Acremonium*, *Trichoderma*
- Chaînes basipètes, ex : *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, *Penicillium*
- Chaînes acropètes, ex : *Cladosporium*, *Alternaria*

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*).

Lorsque les cellules conidiogènes sont différenciées, elles peuvent alors être :

- Directement insérées sur les filaments végétatifs (phialides chez *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 :

- a) conidiophores disposés parallèlement les uns aux autres, agrégés en une gerbe sporifère nommée corémie (ex : *Graphium*).
- b) conidiophores agrégés en coussinets superficiels nommé sporodochie (ex : *Myrothecium*).

La présence des chlamydo-spores peut aider à l'identification, notamment des espèces du genre *Fusarium*.

Ce sont des éléments de résistance, formés à partir du filament mycélien ou à son extrémité, ayant une paroi épaisse. Contrairement aux autres spores, les chlamydo-spores ne possèdent pas de mécanismes de libération permettant leur dissémination à maturité. Bien qu'elles puissent être présentes chez presque toutes les espèces lorsque les conditions sont défavorables.

ii) Identification moléculaire

Au cours des dernières années, les progrès de la biologie moléculaire ont été progressivement mis à profit dans l'identification des espèces fongiques.

Ces méthodes reposent sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN) (Peterson *et al.*, 2006 ; Hinrikson *et al.*, 2005 ; Feuilhade de Chauvin, 2005 ; Jin *et al.*, 2004 ; Reiss *et al.*, 1998). Dans l'immense majorité des cas, l'identification moléculaire nécessite un isolement préalable des souches (identification de souches pures et non directement à partir d'un échantillon biologique ou alimentaire), ce qui reste une étape souvent difficile, en particulier pour les souches à croissance lente, qui sont inhibées par la présence d'une flore concurrente. L'obtention du matériel biologique nécessaire repose sur la culture de la souche à identifier pendant un temps suffisant (3 à 10 jours le plus souvent) et sur des milieux adéquats pour obtenir la formation de mycélium sporulé (pour l'analyse de l'ARN) ou non (pour l'analyse de l'ADN, culture en milieu liquide sous agitation). Les méthodes les plus utilisées sont basées sur l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de certaines régions spécifiques et notamment des Internal Transcribed Spacers (ITS) qui correspondent à des portions d'ADN ribosomique non transcrite et fortement polymorphe en

fonction des espèces (Hinrikson *et al.*, 2005) (Figure 3). Pour l'étude d'espèces proches phylogénétiquement, il peut être utile (nécessaire) d'ajouter l'étude de la séquence d'autres gènes comme par exemple la bêta-tubuline, la calmoduline, ou le mating type factor (Ramirez-Prado *et al.*, 2008; Varga *et al.*, 2011 ; Carvajal-Campos *et al.*, 2017).

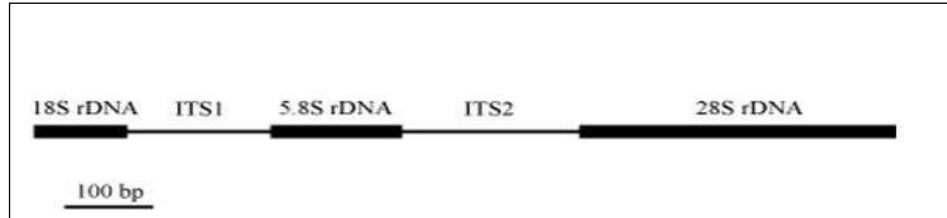


Figure 3 : Représentation schématique de la localisation des ITS 1 et 2 sur l'ADN ribosomique

En fonction des genres fongiques, les gènes cibles pour l'identification d'espèce peuvent varier (Tableau 1).

Ces outils moléculaires sont utiles pour confirmer ou préciser l'identification des espèces morphologiquement très proches, voire caractériser de nouvelles espèces (Carvajal-Campos *et al.*, 2017).

Tableau 1 : Gènes recommandés pour l'identification moléculaire de différents genres fongiques (Samson *et al.*, 2010)

Genus	Databases	Recommended Locus	References
<i>Aspergillus and Teleomorphs</i>	Genbank ¹ ; CBS website	Calmodulin	
<i>Penicillium and Teleomorphs</i>	Genbank ¹ ; CBS website	β- Tubulin	
<i>Fusarium</i>	Fusarium ID databases (http://isolate.fusariumdb.org/)	TEF	<i>Geiser et al., 2004</i>
<i>Trichoderma</i>	TrichOKEY (http://www.isth.info/) ³	ITS ³	<i>Druzhinina et al., 2005</i>
	TrichoBlast (http://www.isth.info/) ³	EF_1X ⁵	<i>Kopchinskiy et al., 2005</i>
<i>Zygomycetes</i>		ITS	<i>Schwars et al., 2006</i>
<i>Alternaria</i>		gpd ⁴	<i>Hong et al., 2005</i>
<i>Yeasts</i>	Genbank ¹ ; CBS website	ITS and D1/D2 region of LSU	

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (go to 'nucleotide Blast' for comparison of nucleotide sequence)

www.cbs.know.nl (go to 'databases' and a drop-down menu will appear with several databases.)

³Identification based on ITS sequences sometimes fails to distinguish between closely related species.

⁴Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gpd) sequences differentiate only between the *A. infectaria* species-gp of the *A. arborescens*/*A. tenuissima* group but not between the last two species groups.

⁵Elongation factor 1α

iii) Identification physiologique

L'étude de l'impact des paramètres environnementaux sur la croissance d'une espèce fongique peut aussi apporter des éléments intéressants d'aide à la diagnose. La grande capacité d'adaptation des moisissures fait que ces paramètres ne peuvent, à eux seuls, permettre l'identification au stade d'espèce. Cependant, ils peuvent apporter des éléments complémentaires à une analyse morphologique.

Les principaux paramètres pouvant influencer la croissance fongique sont les mêmes que ceux qui influencent la croissance de tout microorganisme.

- **Activité de l'eau (a_w)** : L' a_w 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 et synthétisent bien des mycotoxines pour des activités en eau voisines de 0,85 (Tableau 2).

Par conséquent, beaucoup de produits dont l'activité hydrique ne permet pas la croissance bactérienne peuvent être colonisés par les moisissures.

Tableau 2 : Gamme d'activité de l'eau permettant la croissance de certaines espèces des genres *Aspergillus* et *Penicillium* (Belli *et al.*, 2004 ; Adebajo *et al.*, 1994 ; Pitt *et Hocking*, 1977)

Espèces fongiques	a_w
<i>A. niger</i>	0.90 - 0.98
<i>A. flavus</i>	0.84 - 0.99
<i>A. ochraceus</i>	0.83 - 0.87
<i>A. parasiticus</i>	0.82 - 0.98
<i>P. viridicatum</i>	0.83 - 0.86
<i>P. cyclopium</i>	0.82 - 0.86

Les moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont généralement capables de se développer à des a_w voisines de 0,8 à 25°C ; elles peuvent donc se développer dans les aliments pauvres en eau libre comme les grains de céréales, les fruits secs, les produits dont l'activité hydrique a été réduite par ajout de soluté (produits de salaison sèche, confitures...) (Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002). D'autres espèces fongiques sont, au contraire, hygrophiles. Ainsi, les *Fusarium* ou les mucorales ne peuvent se développer que pour des a_w supérieurs à 0,9. Il s'agit d'espèces se développant sur les plantes vivantes, au champ, avant la récolte ou juste après, avant le séchage des grains ou sur des substrats très humides (Mohamed *et al.* 2012 ; Liorens *et al.*, 2004 ; Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002 ; Sauer *et al.*, 1978) (Tableau 3).

Tableau 3 : Impact de l' a_w sur la croissance des espèces fongique (Samson *et al.*, 2010)

Materials with a high water activity ($a_w > 0,9$)	<i>Chaetomium, Fusarium cadophora, Phoma, Stachybotrys, Trichoderma, Ulocladium, Yeats, Rhodotorula</i>
Materials with moderate or fluctuating water activity ($0,9 > a_w > 0,85$)	<i>Alternaria tenuissima, Aspergillus fumigatus, Aspergillus versicolor, Aspergillus sidowi, Cladosporium spp, Penicillium brevicompactum, Penicillium chrysogenum</i>
Materials with a lower water activity ($a_w < 0,85$)	<i>Aspergillus versicolor, Eurothium spp., Penicillium chrysogenum, Penicillium brevicompactum, Wallemia</i>

- **pH** : Les micromycètes peuvent se développer dans une large gamme de pH ; ils se développent généralement facilement à des pH compris entre 3 et 8, leur croissance étant souvent optimale entre 5 et 6. En raison de leur acidité ($pH < 6$) de nombreux aliments tels que les légumes et les fruits sont beaucoup plus exposés à une altération fongique que bactérienne. En 1997, Keller a étudié l'effet du pH sur la croissance de *Fusarium proliferatum*. La croissance du champignon était maximale à un $pH=5,6$ (Keller *et al.*, 1997). Pour les *Aspergillus*, la gamme de pH permettant leur développement est encore plus large et va de 2,1 à 11,2 (Ayerst *et al.*, 1969 ; Olutiola *et al.*, 1976)

- **Présence d'oxygène** : Les champignons sont des microorganismes aérobies stricts ; ils ont besoin d'oxygène pour une croissance normale. Toutefois, leur développement est peu affecté par des teneurs en oxygène 10 fois plus faibles (2,1%) que celle de l'atmosphère. C'est ce qui explique la croissance possible de *P. roqueforti* dans les cavités de la pâte fromagère.

- **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-Leszkowicz *et al.*, 2001).

Il existe aussi des espèces psychrophiles, comme, par exemple, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium tricinctum*. 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-Leszkowicz *et al.*, 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 (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2002). C'est aussi le cas d'*Aspergillus fumigatus*. Sa capacité à se développer à des températures proches de 40°C explique son pouvoir pathogène (agent de mycoses internes), son rôle dans la détérioration des matières organiques (compost) et peut-être mise à profit dans l'isolement et l'identification de cette espèce (Latgé *et al.*, 1999 ; Bhabhra *et Askew*, 2005).

1.2.2. Classification des moisissures

Les caractéristiques morphologiques des différents genres/espèces fongiques ont permis d'établir une classification des moisissures.

Le règne des Mycètes comprend des divisions, elles-mêmes subdivisées en embranchements puis en classes ; les classes englobent des ordres qui rassemblent des familles ; une famille peut comprendre un ou plusieurs genres, et le genre rassemble une ou plusieurs espèces. Chaque moisissure 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 : le règne des champignons est divisé en quatre « *phylum* » ou embranchements: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, et *Basidiomycota* (Figure 4).

- **Les chytridiomycètes et les oomycètes :** Ils sont caractérisés par la présence de spores munies de flagelles (un pour les chytridiomycètes, deux pour les oomycètes). Cependant, aujourd'hui, la nomenclature ne retient dans le règne des champignons que les chytridiomycètes, en raison de la présence de chitine dans leur paroi et de leur mode de nutrition qui se fait par absorption (Chabasse *et al.*, 2002).

- **Les zygomycètes :** Ils possèdent un mycélium siphonné (non septé) et sont caractérisés par leur aptitude à fusionner leur mycélium pour former une gamétangie qui donnera des zygospores. On estime à plus de 100 000 le nombre d'espèces fongiques de ce phylum, plus de 1000 d'entre elles pouvant contaminer les aliments (Castegnaro *et Pfohl-Leskowicz*, 2002).

- **Les ascomycètes et basidiomycètes :** Ils produisent des spores sexuées, respectivement dans des sacs appelés asques ou à l'extérieur des sacs appelés basides (figures 4B et 4C). La germination des ascospores ou des basidiospores donne des filaments cloisonnés.

Ce groupe comprend un grand nombre d'espèces pathogènes pour l'homme et les animaux (levures ascosporeées 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 des Ascomycètes se reproduisent par multiplication asexuée (forme imparfaite ou anamorphe) à l'aide des conidies (Sutton *et al.*, 1998 ; Botton *et al.*, 1990).

Au niveau économique, les ascomycètes jouent un rôle très important, car certaines espèces sont des agents de biodégradation des substrats celluloseux.

De même, certaines espèces peuvent entraîner des altérations des denrées alimentaires et produire des toxines, d'autres interviennent dans des processus de fermentation des industries agro-alimentaires.

- **Les Deutéromycètes (Champignons imparfaits ou *Fungi imperfecti*)** : Il s'agit d'un groupe « artificiel » qui comprend des genres ou des espèces dont la forme parfaite n'existe pas ou n'est pas connue, c'est-à-dire que seul le stade anamorphe est décrit.

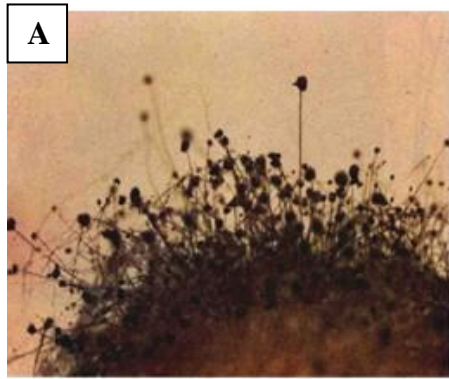
Désormais, on essaye de regrouper les formes asexuées dans les divisions auxquelles appartiennent leurs phases sexuées (soit *Ascomycota* ou *Basidiomycota*).

Les données biochimiques ou moléculaires permettent généralement d'attribuer ces champignons imparfaits à l'un ou l'autre de ces groupes.

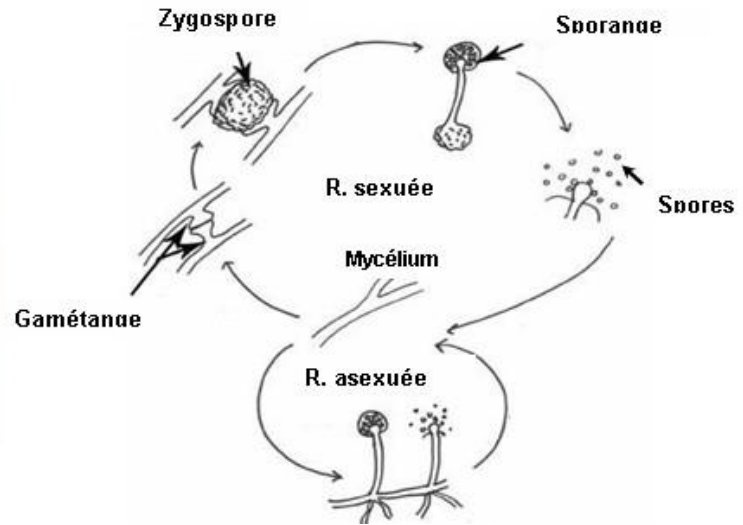
Les *Deutéromycètes*, qui sont unicellulaires ou à thalle filamenteux septé, réunissent le plus grand nombre d'espèces pathogènes pour l'homme et les animaux. Ils sont divisés en 3 classes :

- les *Blastomycètes* qui comprennent 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 pour lesquels les conidies sont produites dans des structures de protection : les pycnides (*Sphaeropsidales*) et les acévules (*Mélanconiales*).

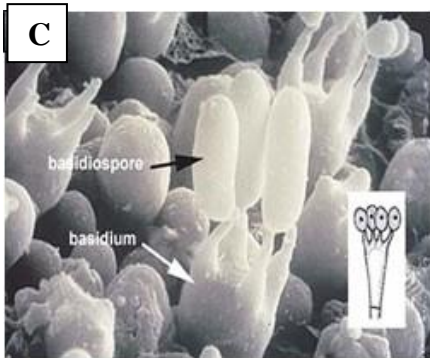
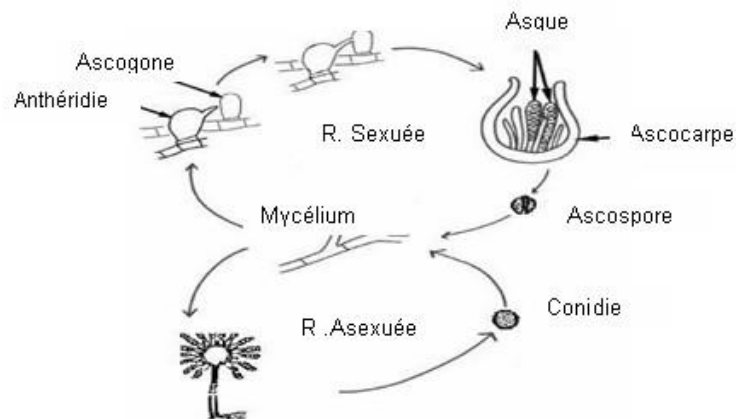
Les *Hyphomycètes* et les *Coelomycètes* comprennent des agents de biodégradation mais aussi des moisissures utiles en biotechnologie



Mucor



Aspergillus sp



Melanogaster sp

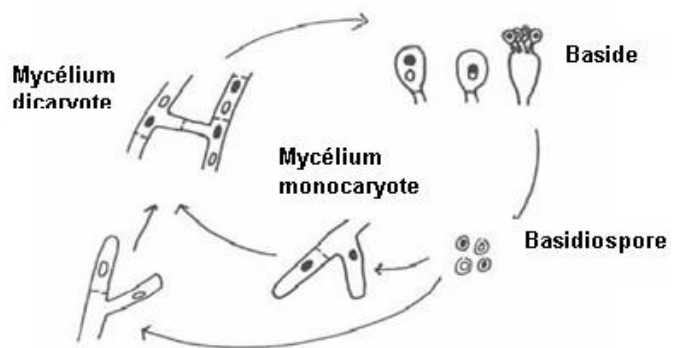


Figure 4 : (A): Les zygomycètes, (B): Les ascomycètes, (C): les basidiomycètes

1.3. Les mycotoxines :

1.3.1. Origine et biosynthèse

Le mot ‘‘mycotoxines’’ vient des termes ‘‘mycos’’ (champignon) et ‘‘toxicum’’ (poison). Les mycotoxines sont des produits du métabolisme secondaire de certaines espèces fongiques. Ce sont des composés de faibles poids moléculaires, pouvant être produits sur les plantes vivantes au champ ou, plus tard, au cours du stockage. Ces molécules sont toxiques pour l’homme et les animaux. Plus de 300 métabolites secondaires ont été identifiés mais il est classiquement admis qu’environ une trentaine possède de réelles propriétés toxiques préoccupantes pour la santé publique humaine ou animale. Ces toxines se retrouvent à l’état de contaminants naturels de nombreuses denrées alimentaires, notamment les céréales mais aussi les fruits secs, les épices, les fourrages ainsi que les aliments composés et manufacturés contenant ces matières premières et destinés à l’alimentation humaine et animale. (AFSSA, 2009).

L’origine chimique des mycotoxines est très diverse. Certaines dérivent des acides aminés (alcaloïdes de l’ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, slaframine, gliotoxine, roquefortine, sporodesmine,), des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxine, patuline, citrinine, acide pénicillique, stérigmatocystine, zéaralénone), des dérivés terpéniques (diacétoxyscirpenol, fusarénone, désoxyvalénol, roridines, toxines T-2, verrucarine) ou encore des dérivés d’acides gras (fumonisines, alternariol) (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1999).

1.3.2 Conditions de toxinogénèse

Les mycotoxines peuvent être produites à tous les stades de la chaîne alimentaire depuis le champ jusqu’au produit fini (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1999). Elles peuvent être produites au champ (avant récolte), lors du transport, pendant le stockage ou au cours de la transformation. La biosynthèse de ces métabolites secondaires toxiques par les moisissures dépend de plusieurs facteurs biotiques (liés à la souche fongique) et abiotiques (conditions environnementales).

i) *Facteurs biotiques*

Au sein d'une espèce toxigène donnée, la capacité de production des mycotoxines n'est pas présente chez toutes les souches. De même, une moisissure peut produire plusieurs mycotoxines simultanément. Par exemple, certaines souches d'*A. flavus* peuvent produire simultanément de l'AFB1 et de l'acide cyclopiazonique. La production de différentes toxines peut aussi être conditionnée par le milieu sur lequel se trouve la souche fongique. C'est par exemple le cas de la production de déoxynivalénol ou de zéaralénone par certaines souches de *Fusarium graminearum* (Duverger *et al.*, 2011). De plus, une même mycotoxine peut être produite par des espèces différentes voire même par des espèces appartenant à des genres différents (ex. l'ochratoxine A produite par certaines espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*) (Mitchell *et al.*, 2004).

ii) *Facteurs abiotiques*

La synthèse des mycotoxines est directement liée à la croissance fongique. De ce fait, les facteurs environnementaux qui influent sur la toxigénèse des moisissures sont les mêmes que ceux qui modulent la croissance fongique : la température, l'activité de l'eau (a_w), le pH, la composition gazeuse et la nature du substrat. De manière générale, la production des mycotoxines aura lieu dans des conditions environnementales plus étroites que celles permettant la croissance fongique.

- **La Température :**

La température optimale pour l'élaboration de mycotoxines est généralement proche de la température optimale de croissance.

Les aflatoxines peuvent être synthétisées entre 12-35°C avec un optimum entre 24-28°C (Reiss *et al.*, 1998). *Aspergillus flavus* et *A. niger* peuvent se développer entre 8 et 45 °C (Pitt *et Hocking*, 1997). A 5°C, les *Aspergillus* ne peuvent produire ni les aflatoxines, ni l'OTA, alors que les *Penicillium* et les *Fusarium* sont capables de produire certaines mycotoxines (Northolt *et Bullerman*, 1982; Weidenbörner 1998).

- **L'activité de l'eau : a_w**

La disponibilité en eau nécessaire à la toxinogénèse est supérieure à celle permettant la croissance fongique (Pfohl-Leszczowicz *et al.*, 2001).

A titre d'exemple, *Penicillium verrucosum* peut se développer à partir d'une a_w de 0,80 mais ne produira de l'OTA que pour une $a_w \geq 0,85$ (Cairns-Fuller *et al.*, 2005).

De même, si *A. flavus* peut se développer sur un milieu dont l' a_w est de l'ordre de 0,75, la production des aflatoxines par cette espèce nécessite une valeur d' a_w minimale comprise entre 0,83 et 0,87. (Lahouar *et al.*, 2016; Astoreca *et al.*, 2012; Mohamad S. *et al.*, 2012; Schmidt, Heydt *et al.*, 2009; Pfohl-Leszczowicz *et al.*, 2001).

- **Le pH :**

La plupart des moisissures se développent facilement dans une gamme de pH allant de 4 à 9 avec un optimum de 4,5 à 6,5. La production des mycotoxines a lieu pour des pH voisins des pH optimaux de croissance (Weidenböner *et al.*, 1998).

- **Composition gazeuse**

La plupart des moisissures sont aérobies. La réduction de la pression partielle en oxygène et surtout l'accroissement de la teneur en CO_2 ont un effet dépresseur important sur la toxinogénèse. Taniwaki *et al.* (2001) ont montré qu'une teneur de 40% en CO_2 et 1% en O_2 réduisent de 65% la croissance d'*A. flavus* et une inhibition totale de la production d'AFB1.

En outre, la production d'aflatoxine B1 sur de l'arachide, modérément réduite entre 21 et 5 % d' O_2 , n'est pratiquement inhibée que lorsque la proportion en O_2 est inférieure à 1%.

L'augmentation de la teneur en CO_2 (20 %), surtout si elle est associée à une réduction en oxygène, provoque une chute importante de la production d'aflatoxines. De même, la production de la patuline et de l'acide pénicillique est réduite à de basses concentrations d'oxygène sans affecter la croissance du champignon producteur.

- **Nature du substrat :**

Les moisissures sont des organismes hétérotrophes, se développant facilement sur des substrats organiques contenus dans les produits alimentaires de base (oléagineux, céréales, produits laitiers etc.). En effet, les céréales et les oléagineux, plus riches en glucides et en lipides sont généralement plus favorables à la production de mycotoxines que les substrats à forte teneur en protéines (Le Bars, 1998). Ainsi, la biogénèse des AFs, de l'OTA, de la stérigmatocystine et de l'acide pénicillique est favorisée, tout d'abord, par la présence de glucides dans le substrat, puis de lipides et enfin la présence de protides qui ont une moindre influence (Lacey *et al.*, 1989). 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 *et al.*, 2001).

1.3.3. Les principales mycotoxines et leurs effets

La grande diversité des espèces fongiques potentiellement productrices de toxines et leurs particularités physiologiques font que les mycotoxines sont des contaminants très fréquents des aliments destinés à l'homme et l'animal. Ainsi, la FAO estime qu'environ 25% des céréales produites dans le monde sont contaminés chaque année (FAO. 2007). Des enquêtes plus récentes, utilisant des méthodes sensibles de détection montrent une fréquence de contamination encore plus élevée avec presque 70% des échantillons contaminés par des niveaux variables de toxines (Figure 5).

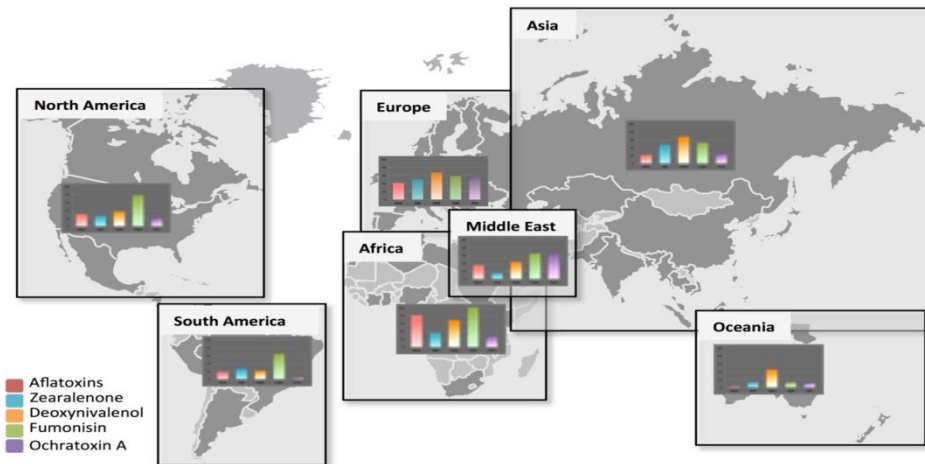


Figure 5 :prévalence de certaines mycotoxines dans les céréales produites dans le monde (d'après Rodrigues et Naehrer, 2012).

L'exposition de l'homme et l'animal peut donc survenir par l'ingestion de nombreux aliments. En fonction des régions du monde, des pratiques agricoles, de la nature des productions, du climat associé, ce ne sont pas les mêmes espèces fongiques et donc pas les mêmes mycotoxines qui seront les plus fréquentes. Les mycotoxines sont des composés très stables, qui résistent à la plupart des procédés utilisés dans la fabrication des aliments. Aussi, l'usage de matières premières contaminées entraînera la contamination des produits finis.

Les principales mycotoxines ainsi que les espèces productrices et les aliments les plus souvent contaminés sont listés dans le Tableau 4.

Tableau 4: Principales mycotoxines, moisissures toxigènes et principaux substrats les plus souvent contaminés (AFSSA *et al.*, 2009; CAST *et al.*, 2003; Krska *et al.*, 2008; Bbosa *et al.*, 2013).

Mycotoxines	Types	Genres	Espèces productrices	Produits les plus contaminés
Aflatoxines	B1, B2, G1, G2, M1	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus de la section Flavi</i>	Céréales (maïs), arachides, épices, fruits secs, lait et produits laitiers (AFM1)
Ochratoxine	A	<i>Penicillium</i>	<i>P.verrucosum</i>	Céréales, cacao, grains de café, épices, jus de raisin et vin
		<i>Aspergillus</i>	<i>A.ochraceus, A.carbonarius</i>	
Trichothécènes	DON	<i>Fusarium</i>	<i>F.langsethiae, F.sporotrichioides, F.poeae, F.graminearum, F.culmorum, F.crookwellense, F.tricinctum, F.acuminatum, F.equiseti, F.solani</i>	Céréales (blé, avoine et maïs)
	T-2 HT-2		<i>F.equiseti, F.poeae, F.sporotrichioides, F.tricinctum, F.langsethiae</i>	
Zéaralénone		<i>Fusarium</i>	<i>F.graminearum, F.culmorum, F.crookwellense</i>	Céréales
Acide cyclopiazonique		<i>Aspergillus</i>	<i>A.flavus, A.oryzae, plusieurs espèces de la section flavi</i>	Céréales, épices, fruits secs
		<i>Penicillium</i>	<i>P.camemberti</i>	
Patuline		<i>Penicillium</i>	<i>P.verrucosum, P.expansum</i>	Céréales, pommes, poires
		<i>Aspergillus</i>	<i>A.clavatus</i>	
		<i>Byssochlamys</i>	<i>B.nivea</i>	
Fumonisines	B1, B2, B3	<i>Fusarium</i>	<i>F.verticillioides, F.proliferatum</i>	Maïs, Riz
Stéigmatocystine		<i>Aspergillus</i>	<i>A.flavus, A.nidulans, A.versicolor</i>	Céréales, arachides, épices, noix fruits secs,
Citrinine		<i>Aspergillus</i>	<i>A.terreus, A.carneus, A.niveus,</i>	Céréales, arachides, fruits et produits secs, noix, jus de pommes
		<i>Penicillium</i>	<i>P.verrucosum, P.citrinum, P.expansum</i>	
Alcaloïdes de l'ergot		<i>Claviceps</i>	<i>C.purpurea, C.paspali, C.Africana, C.fusiformis</i>	Blé et céréales

Les mycotoxines ont des structures très variées, qui dépendent des voies de biosynthèse. De ce fait, les effets de ces contaminants sur la santé seront extrêmement variables en fonction de leur devenir dans l'organisme et des organes cibles mais aussi en fonction des niveaux et de la durée de l'exposition ainsi, parfois, que de l'âge des personnes (animaux) exposées.

Les organes cibles majeurs et les effets associés à l'exposition aux principales mycotoxines sont rapportés dans le Tableau 5 ci-dessous.

Tableau 4 : Organes cibles et pathologies associées aux principales mycotoxines (CAST *et al.*, 2003; Jarvis et Miller, 2005;

Krska et Crews., 2008; AFSSA *et al.*, 2009; Bbosa *et al.*, 2013; Hamidi *et al.* 2013. Lai *et al.* 2015)

Toxines	Toxicité et organes cibles	Mécanismes d'action cellulaires et moléculaires
Aflatoxines B1, B2, G1, G2 et M1	Hépatotoxicité Génotoxicité Cancérogénicité Immunomodulation	Formation d'adduit à l'ADN Peroxydation lipidique Bioactivation par cytochromes P450 Conjugaison aux GS-transférases
Ochratoxine A	Néphrotoxicité Génotoxicité Immunomodulation	Inhibition de l'activité de la phosphoenolpyruvate carboxykinase Impact sur la synthèse des protéines par compétition Inhibition de la production d'ATP
Patuline	Neurotoxicité, Mutagenèse <i>In vitro</i> Cytotoxicité	Inhibition tyrosine phosphatase (PTP) Perturbation la fonction de barrière intestinale
Deoxynivalenol	Hématotoxicité Immunomodulation Problèmes digestifs	Induction de l'apoptose sur progéniteur hématopoïétique et cellules immunitaires Impact sur la synthèse des protéines (élongation de la chaîne protéique)
T-2 et HT-2	Reprotoxicité Neurotoxicité Génotoxicité Immunotoxicité	
Zéaralénone	Troubles de la fertilité et de la reproduction	Liaison aux récepteurs oestrogéniques Bioactivation par des réductases Conjugaison aux glucuronyltransférases
Fumonisine B1, B2, B3	Lésion du système nerveux central Hépatotoxicité, Génotoxicité Immunomodulation	Inhibition de la synthèse de céramide Altération du rapport sphinganine/sphingosine Altération du cycle cellulaire

Parmi les centaines de toxines identifiées à ce jour, les aflatoxines sont probablement les plus importantes en santé publique. En effet, l'aflatoxine B1 est la seule mycotoxine classée comme cancérigène chez l'homme et c'est l'agent cancérigène naturel le plus puissant connu à l'heure

actuel. L'AFB1 est produite par des espèces fongiques appartenant au genre *Aspergillus* et plus spécifiquement à la section *Flavi*. Ces espèces sont des contaminants fréquents des zones tropicales et subtropicales et, compte tenu de la densité de population de ces régions, ce sont presque 4 milliards de personnes qui sont exposées à ces contaminants dans leur alimentation.

Nous allons donc maintenant nous focaliser sur les espèces fongiques produisant les aflatoxines ainsi que sur ces contaminants.

2. LES *ASPERGILLUS* DE LA SECTION *FLAVI*

2.1. Le genre *Aspergillus* : caractéristiques générales

Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002). Ils peuvent se développer sur de très nombreux substrats : matière organique en décomposition, sol, compost, fruits secs, arachides, céréales... De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont aussi présentes dans les environnements intérieurs, notamment dans la poussière et l'air. (Morin et al., 1994 ; Aleksic et al., 2017).

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). D'autres espèces ont un intérêt industriel car utilisées pour produire certaines enzymes d'intérêt ou participer à la fabrication d'aliments (sauce soja, sake) (Bennett et al., 2010 ; H. Kaya-Celiker et al., 2015).

La taxonomie du genre *Aspergillus* a été mise en place pour la première fois en 1729, par Micheli. Les *Aspergillus* appartiennent à l'embranchement des Ascomycètes, à la classe des Eurotiomycètes, à l'ordre des Eurotiales, à la famille des *Eurotiales* qui comprend 56 genres. Le genre *Aspergillus* comprend 250 espèces, regroupées au sein de 18 sections : *Flavi*, *Nigri*, *Circumdati*, *Terrei*, *Fumigati*, *Clavati*, *Nidulantes*, *Candidi*, *Usti*, *Restricti*, *Flavipedes*, *Cremeri*, *Cervini*, *Sparsi*, *Ornati*, *Warcupi* et *Zonati* (Raper et Fennell., 1965 ; Peterson et al., 2000 ; Samson et Varga., 2010 ; H. Kaya-Celiker, et al., 2015). Plus récemment, la section *Aspergillus* a été ajoutée. Elle correspond aux espèces autrefois regroupées sous le nom d'*Eurotium* (Chen et al., 2017). De plus, l'utilisation des

outils de biologie moléculaire a conduit à l'identification fréquente de nouvelles espèces et la taxonomie de ce genre fongique est donc en constante évolution : *A. hancockii* (Pitt *et al.*, 2017) ; *A. korhogoensis* (Carvajal Campos *et al.*, 2017).

La description des *Aspergillus* est basée sur leur morphologie et en particulier la couleur des colonies, l'aspect des têtes aspergillaires, l'aspect des conidies, des conidiophores. (Rapper et Fennell, 1965 ; Samson *et al.*, 2006). Elle est aussi basée sur l'analyse moléculaire de la séquence de certains gènes et en particulier les ITS, la Béta-tubuline et la calmoduline (ElMaghubi *et al.*, 2013 ; Adjovi *et al.*, 2014 ; Carvajal-Campos *et al.*, 2017).

- **Caractéristiques macroscopiques** : ce sont des champignons filamenteux qui présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques (gélose au malt, Czapek Yeast Agar, YES agar et Malt salé). 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. Les *Aspergillus* forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses. La couleur de colonies permet parfois une orientation rapide de l'identification : par exemple *Aspergillus candidus* est blanc, *Aspergillus ochraceus* est ocre (d'où son nom), *Aspergillus niger* est noir et les autres comme *Aspergillus glaucus* et *Aspergillus flavus* sont dans les tons verts. Cependant, l'identification des espèces morphologiquement proches nécessite un examen plus approfondi, à l'échelle microscopique.

- **Caractéristiques microscopiques** : les *Aspergillus* sont caractérisés par un appareil végétatif (thalle) formé de filaments mycéliens hyalins. Les conidiophores sont caractérisés par une cellule pied basale et sont renflés à leur extrémité distale en une vésicule sphérique ou ovoïde (Rapert & Fennell, 1965 ; Varga *et al.*, 2011) . Une ou deux rangées de stérigmates (selon les espèces) prennent naissance sur cette vésicule. C'est à partir de ces stérigmates que les spores se forment en de très longues chaînes. Les spores sont claires, plus ou moins colorées ou noirâtres. Elles sont globuleuses à ovoïdes et mesurent de 2,5 à 4 µm (Figure 6)

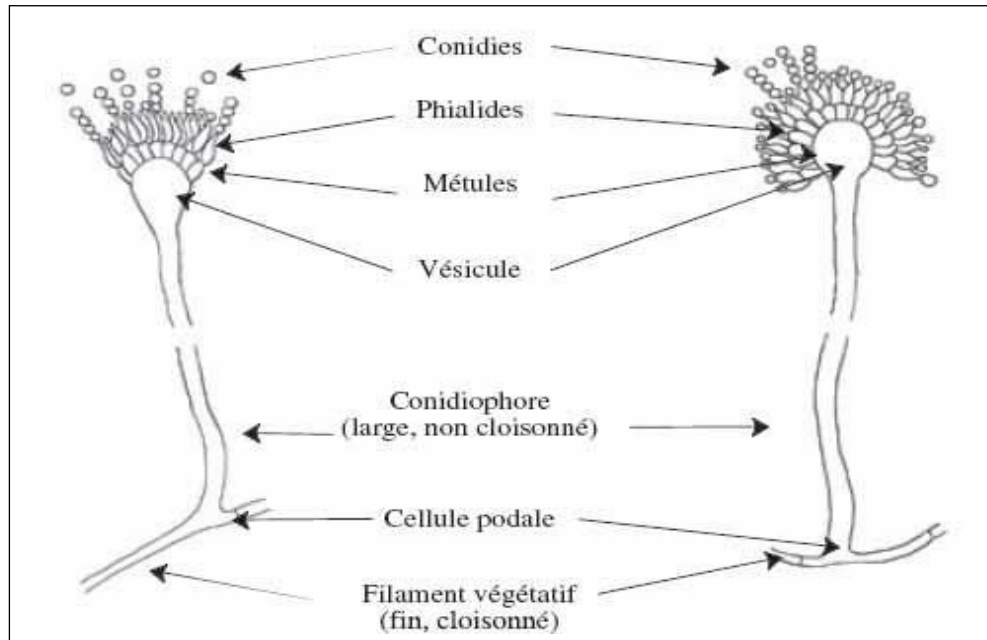


Figure 6 : Caractéristiques microscopiques des espèces appartenant au genre *Aspergillus*

2.2. La section *Flavi*

Parmi les différentes sections que compte le genre *Aspergillus*, la section *Flavi* est particulièrement importante car elle regroupe les espèces capables de produire les aflatoxines.

Pendant longtemps, la section *Flavi* était constituée de 3 espèces : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, et *Aspergillus nomius*. Des études plus récentes ont montré que cette section regroupait 33 espèces, qui peuvent être réparties selon 8 clades : *flavus*, *tamarii*, *nomius*, *alliaceus*, *togoensis*, *leporis*, *avenaceus* et *bertholletius* en fonction de leurs caractéristiques moléculaires (Singh et al., 2018; Frisvad et al., 2019)

Nous allons maintenant décrire plus en détail les principales espèces de cette section, c'est-à-dire celles qui sont les plus fréquemment isolées sur des aliments

2.2.1. *Aspergillus flavus*

Les colonies sont vert-jaune, relativement planes avec une marge blanche de 1 à 2 mm. Les revers sont incolores à jaunâtres. Les conidiophores sont longs et rugueux. Les têtes aspergillaires sont majoritairement radiées et bisériées (2 rangées de stérigmates) et splittent en vieillissant. Quelques têtes en colonne peuvent être présentes dans le mycélium aérien. La vésicule est

subglobose (10 à 65 μm de diamètre). Les conidies sont oblongues et lisses ou légèrement rugueuses (3,5 à 4,5 μm) (Figure 7). (Raper & Fennell, 1965 ; Pitt & Hocking, 1997 ; Samson *et al.*, 2006). La production de sclérotes est possible. Cette espèce peut produire des aflatoxines de type B et de l'acide cyclopiazonique.

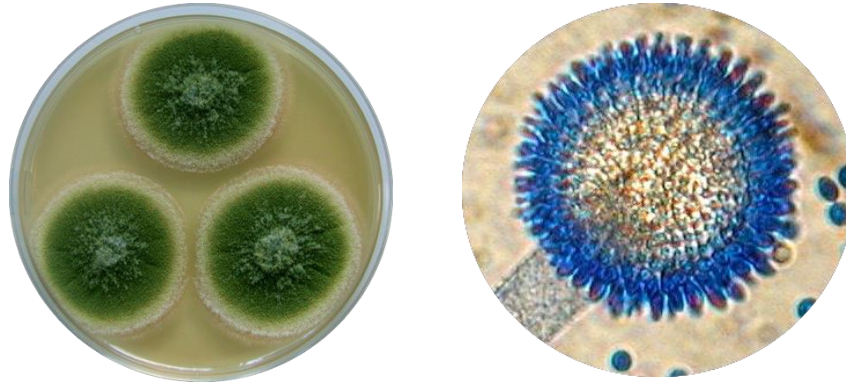


Figure 7: Aspect microscopique (gauche) et macroscopique (droite) d'*Aspergillus flavus*, après culture sur MEA à 25°C pendant 5 jours

2.2.2. *Aspergillus parasiticus*

Les colonies d'*Aspergillus parasiticus* sont vert foncé, couleur lierre, plus floconneuses que celle d'*Aspergillus flavus* sur MEA. Les conidiophores sont incolores, de taille variable (300-700 μm). Leur paroi est lisse ou rugueuse dans la partie distale. Les vésicules sont globuleuses (20-35 μm), les phialides sont pour la plupart unisériées (>90%). Les conidies sont globuleuses, très échinulée voir épineuses (3,5-5,5 μm) (Figure 8) (Hedayti *et al.*, 2007 ; Samson *et al.*, 2010). Cette espèce produit les aflatoxines B1, B2, G1 et G2, l'acide kojique, l'acide aspergillique mais pas l'acide cyclopiazonique.

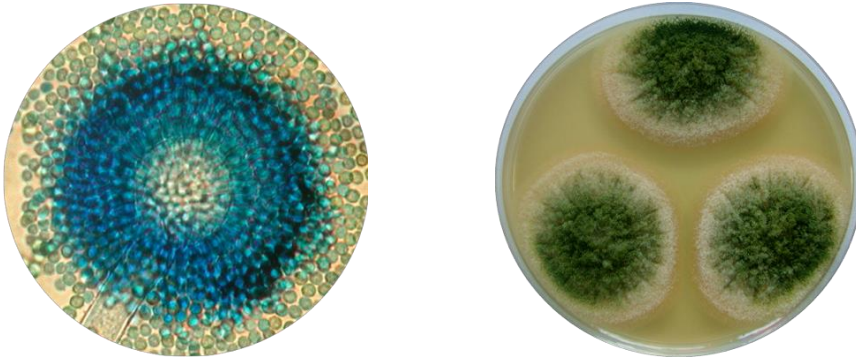


Figure 8 : Aspect microscopique (gauche) et macroscopique (droite) d'*Aspergillus parasiticus*, après culture sur MEA à 25°C pendant 5 jours

2.2.3. *Aspergillus nomius*

Les colonies d'*Aspergillus nomius* sont claires et très floconneuses. La sporulation est faible sur MEA et se limite souvent à la périphérie. Elles peuvent former des petites sclérotés brun-foncé à noires allongées. Les conidiophores sont incolores (300-1100 µm). Leur paroi est échinulée. Les vésicules sont globuleuses à subglobuleuses (25-65 µm) (Figure 9). Les phialides sont uni ou bisériées. Les conidies sont globuleuses à subglobuleuses, échinulée (Kurtzman *et al.*, 1987). Cette espèce produit les aflatoxines B1, B2, G1 et G2, l'acide aspergillique, l'acide kojique mais pas l'acide cyclopiazonique.

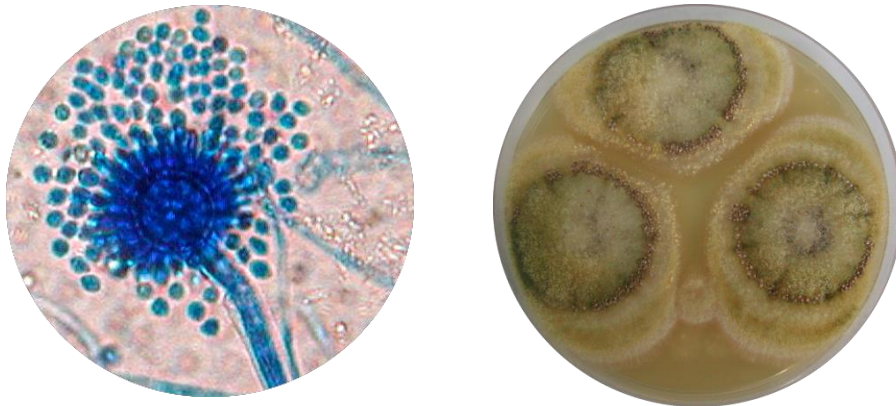


Figure 9 : Aspect microscopique (gauche) et macroscopique (droite) de l'*Aspergillus nomius*, après culture sur MEA à 25°C pendant 5 jours

2.2.4. *Aspergillus tamarii*

Les colonies sont vert bronze foncé, très sporulées avec un pourtour festonné (Figure 10). Le revers est jaune orangé. Les têtes aspergillaires portent des chaînes de spores divergentes. Il y a également quelques petites têtes en colonne. Les conidiophores sont longs, larges et rugueux. Les têtes sont radiées, uni ou bisériées. La vésicule est sphérique et les spores sont grosses, rondes, avec une paroi épaisse et échinulée. Le revers sur milieu AFPA est marron foncé (Varga, Frisvad, et Samson 2011).

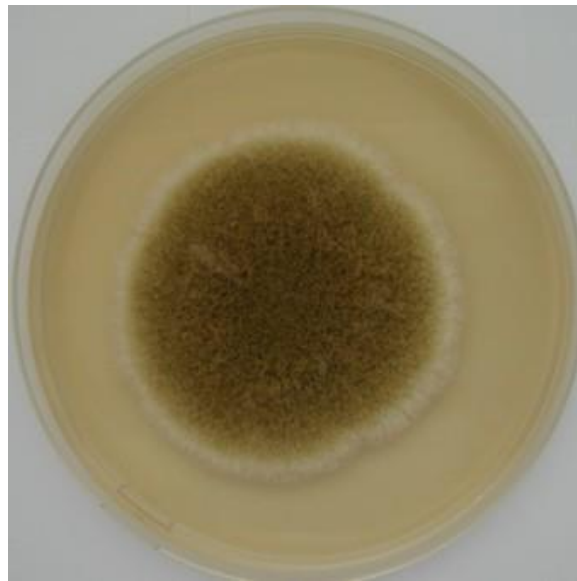


Figure 10 : Aspect macroscopique d'une colonie d'*Aspergillus tamarii*, après culture sur MEA à 25°C pendant 5 jours.

2.2.5. *Aspergillus minisclerotigenes*

Les colonies sont de couleur vert gris, moins sporulées que *l'Aspergillus flavus* mais plus profondes. De nombreuses petites sclérotés noires (< 400µm) sont produites plus ou moins en cercles concentriques (Figure 11). Les conidiophores sont rugueux, et les conidies sont subgloboses, échinulées ou lisses. Les têtes peuvent être uni- ou bisériées avec des vésicules globoses à subgloboses. Cette espèce peut produire les aflatoxines B1, B2, G1 et G2, L'acide cyclopiazoïque et l'acide aspergillique. (Pildain *et al.*, 2008 ; Elmahgubi *et al.*, 2013).



Figure 11 : Aspect macroscopique de colonies d'*Aspergillus minisclerotigenes* après 7j de culture à 25°C sur MEA

2.3. Les Toxines produites par les *Aspergillus* section *Flavi*

2.3.1. Les Aflatoxines

Ces molécules toxiques, ont été découvertes dans les années 60 à l'occasion d'un accident toxique aigu survenu en grande Bretagne et ayant conduit à la mort de plusieurs dizaines de milliers de dindonneaux (Turkey X disease) (Blount, 1961). A cette occasion, les aflatoxines ont pu être isolées à partir des aliments contaminés. Le nom « Aflatoxine » vient de l'espèce identifiée à l'époque comme responsable de la synthèse de cette toxine : A pour « *Aspergillus* », fla pour l'espèce *flavus* et toxine pour montrer l'effet nocif du métabolite.

2.3.1.1 : structures et propriétés chimiques

Les aflatoxines sont une famille regroupant plusieurs molécules dont quatre membres peuvent être retrouvés dans les denrées contaminées par les espèces fongiques productrices de ces toxines: l'aflatoxine B1, B2, G1 et G2. Les lettres utilisées font référence à la fluorescence naturelle de couleur bleue (B) ou verte (G) sous rayons UV et les numéros désignent les molécules majeures et mineures. Il s'agit de molécules à structure polycyclique appartenant à la classe des furanocouma-

rines (Figure 12). Il existe également d'autres aflatoxines ; on en compte au total plus d'une douzaine (M1, P1, Q1, B2a, G2a, etc.). La plupart sont des produits issus de la métabolisation hépatique des quatre molécules produites par les moisissures dans les aliments (IARC, 2002). Par exemple, après une ingestion d'aliments contaminés, l'AFB1 est transformée dans le foie des mammifères par le cytochrome P450 en plusieurs métabolites dont le principal est l'aflatoxine M1 (AFM1) qui est produit par hydroxylation du carbone tertiaire du cycle di-furanocoumarine. Le groupement hydroxyl formé rend l'AFM1 plus soluble dans l'eau et donc rapidement excrétée dans le lait, l'urine, la bile et les fèces des mammifères. L'AFM1 doit d'ailleurs son nom à sa présence dans le lait (ou « Milk ») des animaux consommant une alimentation contaminée par l'AFB1 (Becker-Algeri *et al.*, 2016).

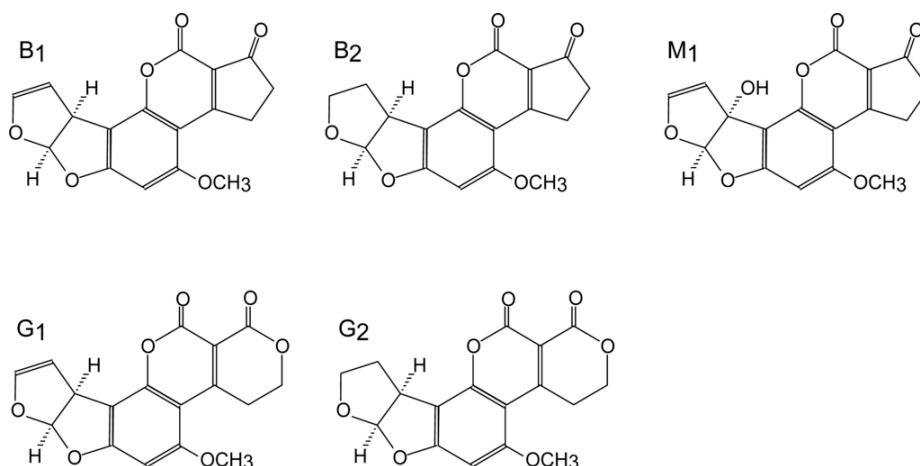


Figure 12 : Structure des 5 principales aflatoxines AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 et AFM1

Les aflatoxines sont des molécules stables et très résistantes aux différents procédés de transformation alimentaires tels la torréfaction, l'extrusion et la cuisson (Marin *et al.*, 2013). En effet la décomposition des aflatoxines a lieu à de très hautes températures qui sont difficilement compatibles avec les procédés de fabrication ou de transformation des aliments. Par exemple, l'AFG2 est dénaturée à partir de 237°C, l'AFG1 se décompose entre 244-246°C, tandis que l'AFB1 et l'AFB2 s'avèrent être encore plus résistantes, se décomposant respectivement à partir de 268-269 et 286-289°C (IARC, 2002).

Par contre, les aflatoxines sont dégradées sous lumière ultraviolette en présence d'oxygène et dans

des gammes de pH extrêmes (pH < 3 ou pH > 10).

2.3.1.2 : Voie de biosynthèse

La production des aflatoxines, comme celle de tout autre métabolite secondaire fongique, est le résultat final d'une cascade de réactions enzymatiques. Dans une chaîne métabolique, l'enzyme prend en charge directement son substrat et le transforme en un nouveau produit, lui-même substrat d'une nouvelle enzyme. Les précurseurs initiaux de ces cascades métaboliques sont issus du métabolisme primaire et ils vont subir des réarrangements et des réactions enzymatiques très diverses: réductions, oxydations, estérifications, hydrolyses, etc. De ce fait, c'est un ensemble enzymatique coordonné sous forme de complexe ou de cluster enzymatique qui va devoir être mis en route de façon synchronisée par la cellule. En général, les gènes codant pour ces enzymes sont donc activés en même temps et placés sous l'influence de régulateurs communs (Yu *et* Keller, 2005).

Les aflatoxines sont synthétisées à partir d'acétyl-CoA issu du catabolisme de glucose et leur synthèse implique 27 réactions enzymatiques (Figure 13). Le cluster de gènes codant pour les enzymes impliquées dans cette voie métabolique est constitué de 30 gènes s'étalant sur une région de 75 kB du chromosome III, située à 80 kB du télomère (Yu *et* Ehrlich, 2011).

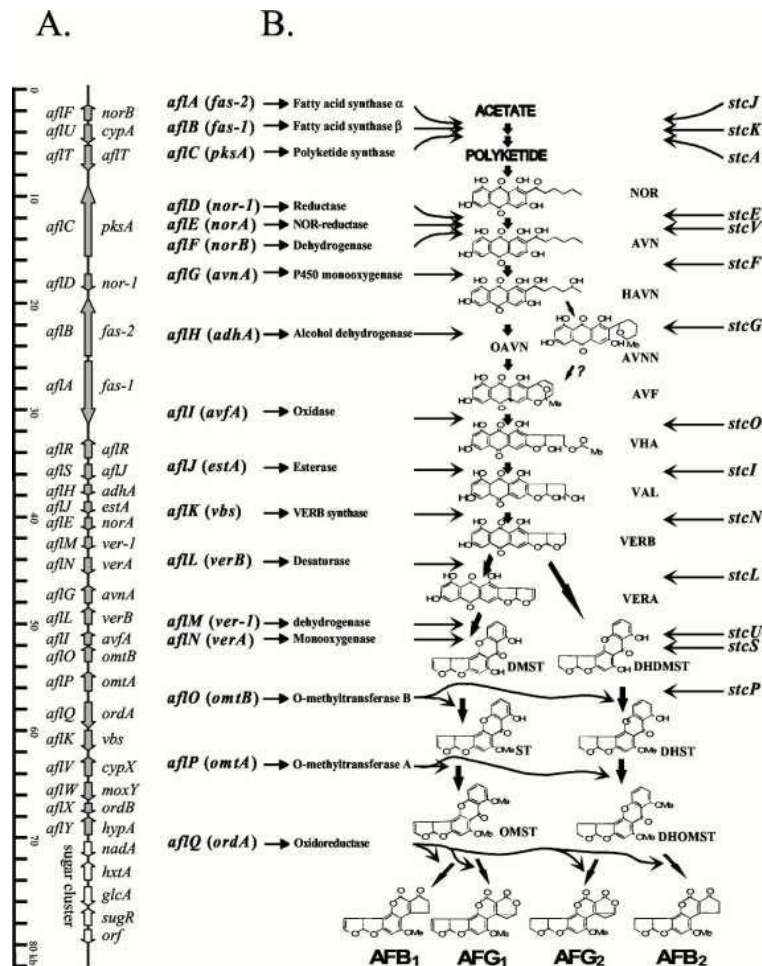


Figure 13 : Cluster de gènes et cascade de réactions enzymatiques permettant la synthèse des aflatoxines Bet G (yu *et al.*, 2004).

2.3.1.3 : conditions nécessaires à la production des aflatoxines

La nature et le niveau de contamination par une mycotoxine dépendent essentiellement de 4 paramètres : (i) la nature de la flore fongique et ses particularités physiologiques, (ii) la nature et la composition du substrat (composition et a_w), (iii) les conditions climatiques associées (température, humidité) et (iv) environnementales (autres microorganismes, inhibiteurs chimiques, présence de lésions sur le substrat, etc.). Ces paramètres jouent un rôle majeur dans l'installation de l'infection fongique et la production de mycotoxines (Bhat *et al.*, 2010). Bien que les valeurs clés pour chacun de ces paramètres soient spécifiques à chaque mycotoxine/espèce productrice, il est

possible que ces paramètres soient favorables simultanément ou successivement dans le temps au développement de plusieurs espèces, entraînant la contamination de l'aliment par plusieurs toxines (Rodrigues & Naehrer, 2012; Streit *et al.*, 2013b, 2012).

i) Particularités de la souche fongique

A. flavus est capable de produire des enzymes hydrolytiques telles des pectinases, α - amylases, protéases, lipases et des cutinases. Elles jouent un rôle essentiel dans sa virulence en le rendant apte à fragiliser les membranes des matrices végétales et y faciliter son entrée (Mellon *et al.*, 2007). L'infection des cultures de maïs se distingue par sa rapidité, ainsi des spores d'*A. flavus* peuvent germer en 4-8h dans les barbes et produire rapidement un réseau extensif d'hyphes (Sinha *et* Bhatnagar, 1998). Parmi les souches de la section *Flavi*, tous les isolats n'ont pas forcément la capacité à produire les aflatoxines. Il semble que la proportion de souches toxigènes soient souvent supérieure à 60% des isolats (Riba *et al.*, 2010; ElMaghubi *et al.*, 2013; Prencipe *et al.*, 2018).

ii) Nature du substrat

Les espèces de la section *Flavi* sont des espèces saprophytes, capables de se développer sur de nombreuses sources organiques nutritives : des débris végétaux, fourrage et carcasses d'animaux, insectes morts, grains et graines (maïs, blé, pistaches, arachides, coton, etc.), épices et fruits secs (Klich *et* Pitt, 1988; Marin *et al.*, 2013 ; Mimoune *et al.*, 2018). Il est probable que la principale source d'infestation initiale des cultures par *A. flavus* soit le sol. Il peut y survivre et même «hiverner» sous forme de débris de mycélium, conidies ou sclérotés, trois formes résistantes pouvant germer et initier une croissance fongique quand les conditions redeviennent favorables (Sinha & Bhatnagar, 1998).

- *Effet du carbone*

Le glucose, le fructose et le sucrose sont considérés par ordre décroissant comme sources de carbone optimales pour le développement de *A. flavus* et *A. parasiticus* ainsi que pour la production d'aflatoxines par ces deux espèces. Une plus faible croissance et peu ou pas de toxigenèse ont lieu sur des substrats contenant du lactose ou du sorbose comme source de carbone. La production d'aflatoxines est la plus importante dans un milieu à 30% de glucose tandis que la croissance est optimale quand cette concentration est de 10% (Luchese *et al.*, 1993 ; Emara, 1997).

- *Effet du pH*

Il a été suggéré que la production des aflatoxines dépend de la perméabilité de la membrane cellulaire fongique, elle-même en lien avec le pH du milieu

Le pH optimal pour la croissance d'*A. flavus* est de 5 (Holmquist *et al.*, 1983) tandis que celui pour la synthèse d'aflatoxines est plutôt proche de 6 (Molina *et al.*, 2002).

- *Effet de l'activité de l'eau*

Comme évoqué précédemment, l' a_w optimale pour la contamination fongique est généralement supérieure à 0.90 (Gibson, 1994). Une forte augmentation de la production d'aflatoxines est observée pour des a_w comprise entre 0.93-0.96 (Battilani, 2013). Cependant, *A. flavus* peut se développer sur des substrats ayant une a_w de l'ordre de 0.78-0.8 (Bhat *et al.*, 2010). Dans ces conditions toutefois, la production d'aflatoxines diminue et s'arrête complètement lorsque l' a_w atteint 0.70 (Battilani *et al.*, 2013).

iii) *Les facteurs climatiques*

- *Effet de la température*

La croissance optimale d'*A. flavus* est observée entre 25 et 37°C, toutefois elle reste possible dans une large gamme de température allant de 12 à 48°C. Sur le plan géographique, la croissance de cette espèce est observée fréquemment sous des latitudes situées entre 26° et 35° lorsqu'elles sont rares pour des latitudes supérieures à 45° (Amaike & Keller, 2011; Klich & Pitt, 1988). Ainsi, les aflatoxines sont, à l'heure actuelle, essentiellement considérées comme des contaminants fréquents des productions des pays chauds. Cependant, les changements climatiques globaux pourraient, à terme, changer la distribution de ces toxines et entraîner la contamination de productions dans des zones jusque-là considérées comme indemnes. C'est notamment le cas de l'Europe. Ainsi, l'aflatoxine B1 fait désormais l'objet d'une surveillance accrue en Europe, et plusieurs alertes signalent des contaminations des productions européennes ayant eu lieu au cours des dernières années (Figure 14). De même, la modélisation de l'impact des changements climatiques sur la contamination mycotoxique des productions, en particulier dans le sud de l'Europe laisse présager d'une importance croissante de ce contaminant à l'avenir (Battilani *et al.*, 2016).

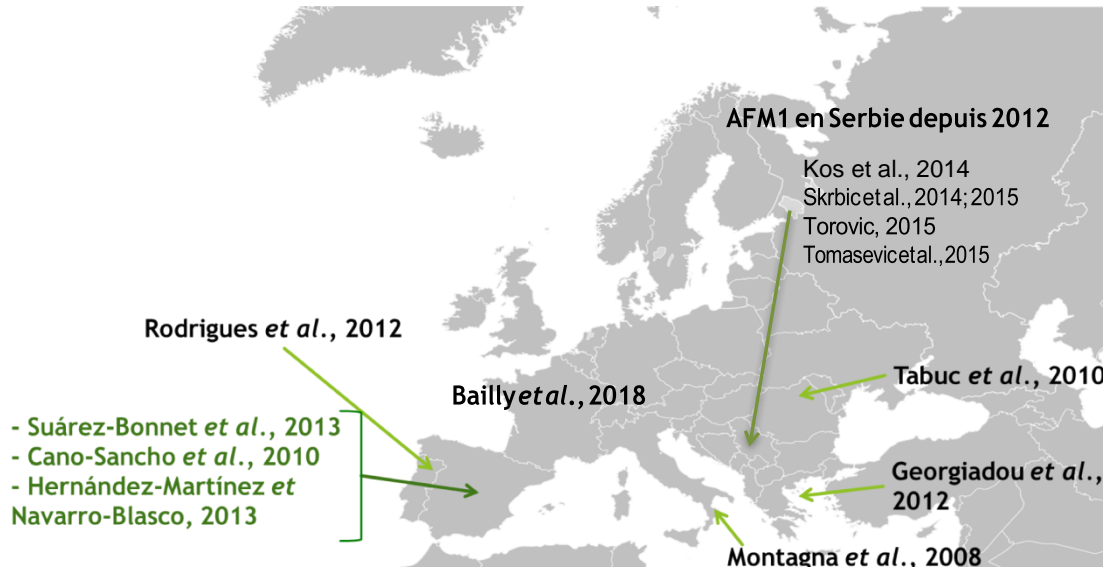


Figure 14 : Pays européens ayant rapporté une contamination de leurs productions par les aflatoxines

- Effet de l'humidité

Les espèces de la section *Flavi* sont semi-thermophiles et semi-xérophiles (Sinha et Bhatnagar, 1998). Ainsi dans des conditions de sécheresse (températures élevées et faible activité de l'eau), *A. flavus* devient très compétitif et domine les autres espèces fongiques du sol qui exigent des niveaux supérieurs d'humidité (Klich, 2007; Sinha & Bhatnagar, 1998). Grâce à sa grande adaptabilité aux conditions environnementales, *A. flavus* peut se développer à la fois sur les cultures au champ, durant la récolte ainsi que plus tard, au cours du stockage. De plus, il a été suggéré que la sécheresse peut aussi affecter la physiologie des plantes qui deviennent plus susceptibles à l'infection fongique. Ainsi, sous des conditions stressantes, ces dernières ne secrètent plus certaines substances protectrices telles les phytoalexines, molécules dotées d'une activité antimicrobienne empêchant la production d'aflatoxines (Klich, 2007).

iv) Les autres facteurs environnementaux

La colonisation d'un substrat par *A. flavus* ne dépend pas seulement des conditions physico-chimiques et de la composition du substrat. Elle peut également être favorisée par la présence d'insectes qui vont faciliter l'accès du champignon aux nutriments en fragilisant les protections naturelles des grains. Ainsi, la présence de certains insectes tels *Ostrinia nubilalis*, le ver du maïs (Battilani et al., 2013), *Mussidia nigrivenella* (foreur des épis de maïs) (Sétamou, 1997) ou *Sitophilus zeamais* (charançon du maïs) (Laprade, 1977) facilitent l'infection fongique et la contamination mycotoxique en créant des sites d'entrée pour le champignon (Sinha & Sinha, 1990 ; 1991).

2.3.1.4 : Métabolisme et toxicité des Aflatoxines

i) Métabolisme

Après ingestion, l'aflatoxine B1 est fortement et rapidement absorbée au niveau de l'intestin (Kumagai, 1989). Ensuite, la molécule mère va subir de nombreuses réactions de métabolisation hépatique et cette étape est essentielle à son activité toxique (Forrester *et al.*, 1990). L'ensemble des métabolites formés sont récapitulés sur la Figure 15 ci-dessous.

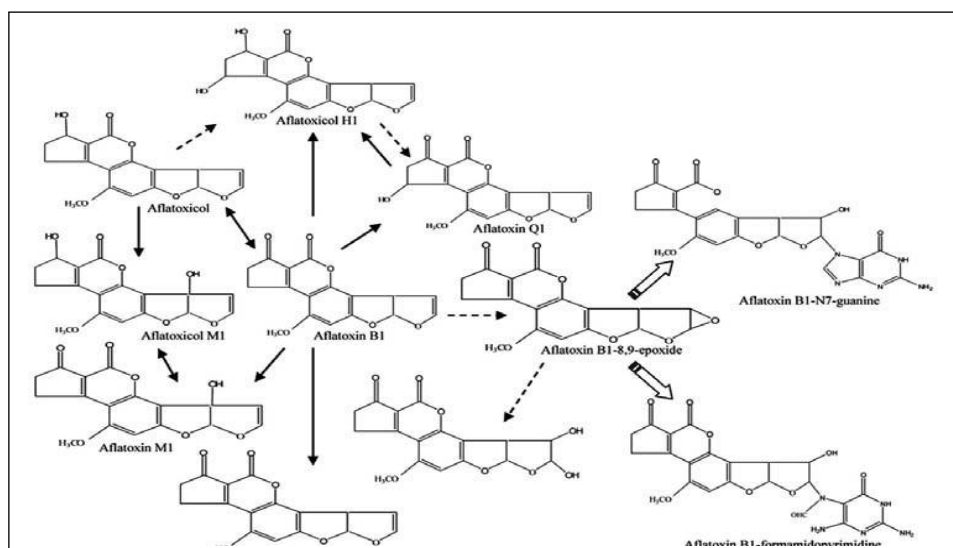


Figure 15 : Biotransformation hépatique de l'AFB1 (Do & Choi, 2007)

La biotransformation des groupements fonctionnels de l'AFB1 entraîne une réduction de la toxicité lors d'hydroxylation (Aflatoxine Q1) (Hsieh *et al.*, 1974 ; Masri *et al.*, 1974) ou de O-déméthylation (Aflatoxine P1) (Stoloff *et al.*, 1972). Cependant, certains métabolites de l'AFB1 conservent une certaine toxicité : l'aflatoxicol a une toxicité résiduelle plus faible que la molécule mère (Fremy, 1982) alors que l'AFM1 conserve une toxicité importante (Prandini *et al.*, 2009).

Enfin, un autre métabolite, l'AFB1 8,9-époxyde est plus toxique que la molécule mère et est responsable de la toxicité cellulaire de la toxine (voir paragraphe suivant).

L'élimination des aflatoxines et de leurs métabolites se fait par excrétion urinaire (AFM1, AFP1, AFQ1), biliaire et lactée sous forme d'AFM1 chez les femelles des mammifères. Cette dernière voie d'élimination constitue une source possible d'exposition des nouveaux nés (Richard, 1998).

ii) Mécanisme d'action cellulaire

L'aflatoxine B1 est transformée dans la cellule hépatique par des cytochromes P450 en AFB1 8,9-époxyde. Le principal mode d'action toxique de cet époxyde est la formation d'adduits à l'ADN et à l'ARN en position N7 de la guanine. Ceci a pour conséquence l'altération de la synthèse des acides nucléiques (blocage de l'ARN polymérase II) et de la synthèse peptidique (blocage de la synthèse des ARNr, ARNt et ARNm) (Figure 16). L'AFB1 8,9-époxyde peut aussi se lier à des protéines (protéines nucléaires, liaison aux histones H3) et en modifier la structure et les fonctions. Ainsi, ce métabolite peut altérer le transport des électrons et la respiration cellulaire (cytochromes b et c) (McClean & Dutton, 1995).

Ces interactions entre le métabolite de l'AFB1 et les constituants cellulaires sont responsables de la toxicité de la molécule, notamment au niveau hépatique.

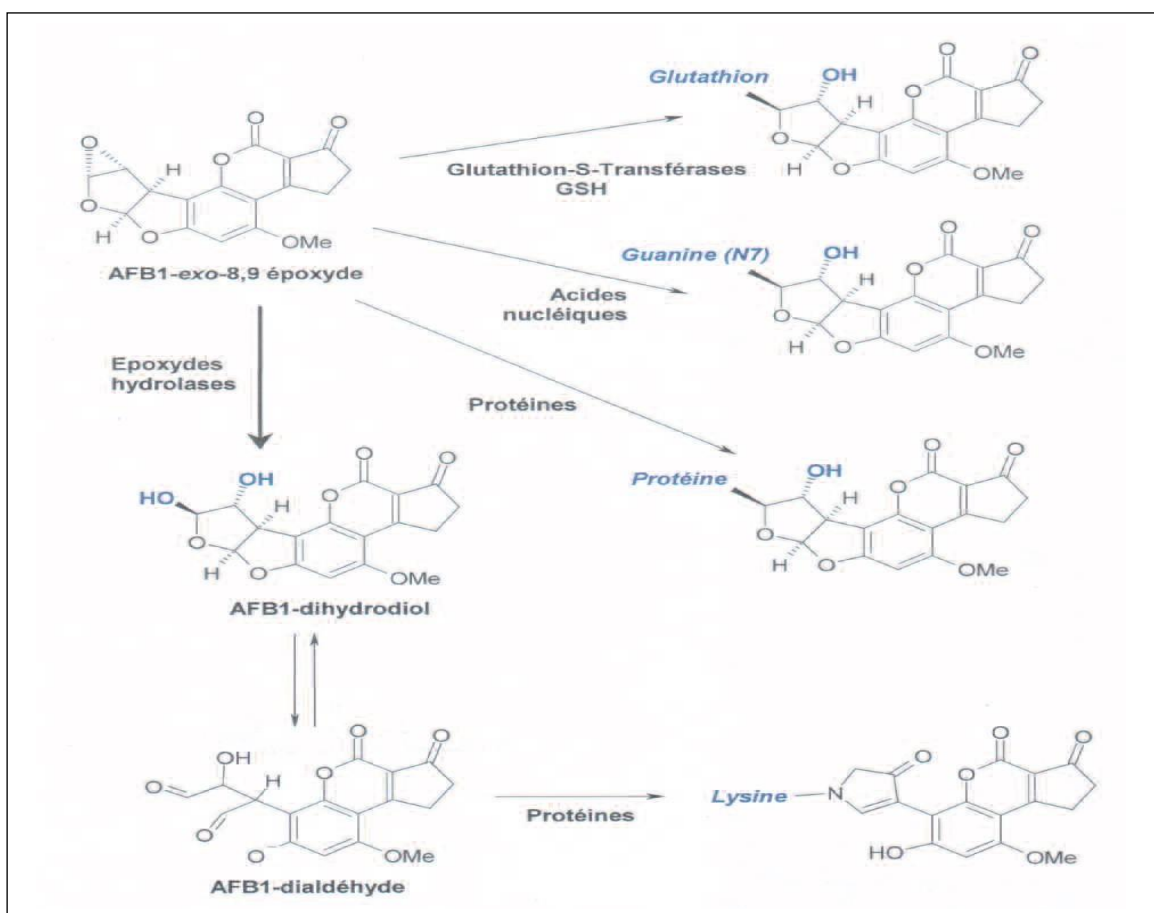


Figure 16 : Interaction de l'AFB1-8,9 époxyde avec les constituants cellulaires (Galtier *et al.*, 2006)

iii) Toxicité

La principale propriété toxique de l'AFB1 est son pouvoir cancérigène pour l'homme et l'animal (Do & Choi, 2007). Cependant, en fonction de la concentration en toxine, de la durée de l'exposition et de l'espèce animale, des troubles divers peuvent être rencontrés. L'aflatoxicose aiguë, faisant suite à l'ingestion de fortes doses de toxines, conduit généralement à la mort rapide des animaux alors que l'aflatoxicose chronique peut aboutir au développement des cancers, à une immunodépression et à d'autres pathologies moins spécifiques (Hussein *et* Brasel, 2001). Dans tous les cas, le foie est le principal organe cible de la toxine.

Des différences substantielles de susceptibilité sont rapportées en fonction de l'espèce, du sexe, du poids, de l'alimentation, de l'exposition concomitante à des agents infectieux, et de la présence

d'autres mycotoxines et substances actives (Do & Choi, 2007). Aussi, seules les principales caractéristiques de la toxicité de l'Aflatoxine B1 sont rapportées ici.

Toxicité aiguë

La toxicité aiguë peut être évaluée par la dose létale 50 (DL50) qui correspond à la concentration capable d'entraîner la mort de la moitié de la population exposée, après une administration unique de la toxine.

Chez l'animal :

Les études de la toxicité aiguë montrent une grande variabilité de sensibilité d'une espèce animale à l'autre (Hussein & Brasel, 2001) (Tableau 6). Ainsi, les lapins et les canards sont très sensibles (DL50 par voie orale de 0,3 et 0,36 mg/kg poids corporel (p.c.), respectivement). Les chevaux, les veaux, les dindes et les moutons sont un peu moins sensibles (DL50 par voie orale de 1, 1,5, 1,36 et 2,0 mg/kg p.c., respectivement). Les poulets sont, quant à eux, relativement résistants aux aflatoxines (DL50 orale de 6,5 mg/kg p.c.) (Pier, 1992). L'intoxication aiguë par les aflatoxines se manifeste généralement par l'apparition d'une insuffisance hépatique aiguë dont les principaux signes cliniques sont : prostration, perte d'appétit, ictère et ascite. L'issue de l'intoxication est le plus souvent fatale. Sur le plan macroscopique, le foie apparaît décoloré et hypertrophié. On peut observer des hémorragies sur plusieurs organes (foie, poumons, reins et glandes surrénales) (AFSSA, 2009). Au plan microscopique, on note une prolifération des canaux biliaires, des lésions de nécrose et une infiltration graisseuse du foie (Do & Choi, 2007).

Tableau 6 : DL50 de l'AFB1 dans certaines espèces animales (Wild & Gong, 2010)

Espèce	DL 50 (mg/kg) p.c.
lapin	0.3
chat	0.6
porc	0.6
chien	0.5-1
rat mâle	5.50
souris	9.00
hamster	10.20
babouin	2,0
macaque	7,8

Chez l'Homme :

Dans la majorité des cas, les teneurs en mycotoxines observées dans les aliments destinés à l'homme ne sont pas suffisantes pour entraîner l'apparition d'une toxicité aiguë. Néanmoins, en ce qui concerne l'AFB1, la consommation de matières premières fortement contaminées a pu entraîner des signes cliniques importants chez les personnes exposées (Hall & Wild, 1994, Wild *et al.*, 1996). Comme chez les animaux, l'organe cible est le foie et les signes cliniques sont dominés par l'apparition d'une insuffisance hépatique : hépatite aiguë, ictère, accompagnés d'une dépression, d'anorexie et de diarrhée. Le premier cas d'aflatoxicose humaine aiguë a été décrit en 1981 au Kenya (Ngindu *et al.*, 1982) et le dernier épisode avéré s'est déroulé d'avril à septembre 2004 dans des provinces du centre et de l'est du Kenya (Probst *et al.*, 2007). Au cours de cette dernière épisode toxique, 317 cas ont été diagnostiqués conduisant à 125 décès. C'est l'ingestion de maïs fortement contaminé par l'aflatoxine B1 qui a été responsable de ces cas (CDC, 2004).

Toxicité chronique

La toxicité chronique des aflatoxines se manifestera après l'ingestion répétée de doses plus faibles que celles conduisant à l'intoxication aiguë. Ce type de toxicité peut être observé aussi bien chez l'homme que chez l'animal.

Chez l'animal :

La toxicité chronique des aflatoxines est la forme d'expression toxique la plus fréquente dans les conditions de contamination naturelle des matières premières et des aliments pour animaux.

Dans la majorité des cas, les signes cliniques observés lors d'intoxication chronique sont beaucoup moins spécifiques et sont principalement caractérisés par une baisse des performances zootechniques (chute de ponte, diminution du gain de poids, réduction de la prise alimentaire) (Vesely *et al.*, 1983 ; AFSSA, 2009).

En parallèle, l'exposition prolongée aux aflatoxines entraîne l'apparition de lésions hépatiques dominées par une hyperplasie des canalicules biliaires et une fibrose. En cas d'exposition prolongée, l'apparition de tumeurs hépatiques a été décrite dans plusieurs espèces animales : les rongeurs, les primates et les poissons (Busby & Wogan, 1984; Eaton & Groopman, 1994). D'autres propriétés toxiques des aflatoxines ont aussi été rapportées. En effet, ces mycotoxines sont tératogènes (Arora *et al.*,

1981). Ainsi, elles entraînent chez les embryons de poulet un retard de développement, une microcéphalie, une anophtalmie, un palais fendu (bec de lièvre) et une déformation des maxillaires.

Les aflatoxines ont aussi un effet immunomodulateur et immunotoxique qui a été démontré essentiellement *in vitro*. L'AFB1 inhibe la phagocytose, la destruction intracellulaire des microorganismes et la production spontanée des radicaux libres oxygénés par les macrophages péritonéaux de rat (Theumer *et al.*, 2003) et, chez le bovin, l'AFB1 entraîne une réduction significative de l'activité phagocytaire des polynucléaires neutrophiles (Mehrzaad *et al.*, 2011). *In vivo*, les effets varient suivant l'espèce, l'âge, le sexe, l'état physiologique de l'animal, le mode d'administration, la composition des aliments. Par exemple, chez le lapin, l'AFB1 entraîne une réduction significative de la prolifération des lymphocytes (Ra & Ma, 1996).

Chez l'homme :

L'intoxication chronique sera liée à la consommation régulière d'aliments contaminés par de faibles niveaux d'aflatoxines, en particulier d'aflatoxine B1. Cette dernière peut entraîner le développement de carcinomes hépatocellulaires, des troubles de la fonction immunitaire ainsi qu'un retard de croissance chez les enfants.

L'aflatoxine B1 est le plus puissant carcinogène hépatique connu. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le carcinome hépatocellulaire est la troisième cause de décès lié au cancer dans le monde. Cette propriété a justifié que l'AFB1 soit classé par le CIRC dans le groupe I des molécules cancérigènes pour l'homme et l'animal (Vainio *et al.*, 1992 ; IARC, 2002).

La plupart des études épidémiologiques tendent à montrer l'existence d'une corrélation entre une exposition chronique à l'aflatoxine B1 via le régime alimentaire et la prévalence du cancer primitif du foie (hépatocarcinomes) (AFSSA, 2009). Il existe une synergie entre la mycotoxine et le virus de l'hépatite B (Omer *et al.*, 2004). C'est surtout dans les zones où le climat est très favorable à la production de la mycotoxine que ces corrélations ont pu être démontrées et que l'aflatoxine B1 représente un enjeu majeur de santé publique : Afrique sub-saharienne, Asie du Sud et Chine. Dans le monde, on estime que les aflatoxines pourraient être responsables de 4,6 à 28,2% des cancers hépatiques (Liu *et Wu*, 2010).

Les aflatoxines ont aussi un effet immunomodulateur et immunotoxique. Cela a été démontré dans une étude qui a examiné le statut de l'immunité cellulaire de 64 Ghanéens en relation avec les niveaux d'adduits de l'AFB1 à l'albumine dans leur plasma. Leurs résultats montrent qu'un taux

plasmatique d'AFB1 élevé est corrélé à des troubles de l'immunité cellulaire qui pourraient diminuer la résistance de l'hôte aux infections (Jiang *et al.*, 2005).

Chez les enfants, les aflatoxines ont un effet négatif sur la croissance. Une étude réalisée au Bénin et au Togo a montré une corrélation entre la teneur en adduits d'AFB1 sur l'albumine sérique et un déficit de poids et de taille des enfants. (Gong *et al.*, 2002). Cette exposition est plus importante chez les enfants après le sevrage, à cause du niveau plus important de contamination des aliments ingérés à partir de cette période (Gong *et al.*, 2004).

Une étude récente montre que, à cause de ces effets sur la santé, l'aflatoxine B1 est le contaminant naturel responsable du plus grand nombre de DALYS (deaths and disability adjusted life years) dans les régions où le climat est favorable à la croissance des espèces productrices et à leur toxigénèse (Gibb *et al.*, 2015).

iv) Réglementation

Compte tenu de leur toxicité (agent génotoxique), le JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), n'a pas fixé une dose maximale tolérable pour les aflatoxines. Selon ce comité, pour protéger les consommateurs des effets délétères des aflatoxines, l'objectif doit être de réduire l'exposition aux aflatoxines au plus faible niveau possible : c'est la règle ALARA (« **A**s **L**ow **A**s **R**easonably **A**chievable »). Le principe ALARA est appliqué quand une substance ne peut être éliminée d'un aliment sans le rejet entier de ce dernier ou sans compromettre sévèrement la disponibilité de ses réserves nutritives majeures. Ce principe a été appliqué aux aflatoxines en 1998 (FAO/WHO, 1999).

Néanmoins, pour protéger les consommateurs de ces toxiques, plus de 100 pays dans le monde ont établi des valeurs seuils pour ces contaminants (FAO, 2003), avec des variations en fonction des pays.

Selon les directives de la FDA (« Food and Drug Administration ») aux Etats Unis, le niveau total d'aflatoxines (AFt) dans les aliments destinés à la consommation humaine ne devrait pas dépasser 20 ppb (**p**articules **p**ar **b**illion équivalent au $\mu\text{g}/\text{kg}$). La norme maximale pour les AFt dans les aliments destinés au bétail et aux volailles est de 100 ppb (Ortega, 2008). Les valeurs fixées par la Commission Européenne sont plus strictes en limitant les valeurs maximales d'aflatoxines dans

les céréales, arachides, épices et fruits secs destinés directement ou indirectement à la consommation humaine et animale (Tableau 7).

L'AFM1 est, elle, réglementée dans le lait utilisé ou les produits dérivés (0.05-0.5 ppb) aux Etats Unis, en Europe et en Chine (Hymery *et al.*, 2014).

Tableau 7 : Valeurs réglementaires en vigueur en UE pour les aflatoxines dans l'alimentation humaine et animale (μg d'AF par kg de matrice alimentaire) (Règlement (EC) N° 1881/2006).

Destination	Toxine	Matrice	Concentration maximale (ppb)
Alimentation Humaine	Aflatoxine B1	Céréales	2 ou 5 selon le produit et les procédés de transformation
		Arachides	2, 5 ou 8 selon le produit et les procédés de transformation
		Céréales	
		Fruits secs	
		Épices	5
		Aliments à base de céréales destinés aux enfants	0,1
	Aflatoxines B1+B2+G1+G2	Céréales	4 ou 10 selon le produit et les procédés de transformation
		Arachides	4, 10 ou 15 selon le produit et les procédés de transformation
		Céréales	
		Fruits secs	
Aflatoxine M1	Lait	0,05	
	Préparations pour les enfants	0,025	
Alimentation Animale	Aflatoxine B1	Matières premières	20
		Fourrage en	5 pour les animaux laitiers

En ce qui concerne le Liban, les limites maximales pour les aflatoxines dans les produits d'alimentation humaine et animale, suivent les normes européennes (FAO, 2004) et les limites fixées par LIBNOR, sont données dans le (Tableau 8)

Tableau 8 : Teneurs maximales en aflatoxines dans les produits destinés à l'alimentation humaine et animale au Liban (Ministère de l'Agriculture, 2004).

Produit	Teneur maximale en aflatoxines en ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
	M1	B1+B2+G1+G2	B1
Fève, noix, amande, cacahuètes, Cajou, noisette, pistache d'Alep, fruits à coque, fruits secs, matières premières et préparations pour alimentation humaine		4	2
Céréales (blé, riz, orge, avoine) selon le produit et son stade de transformation, préparations à base de céréales, maïs et ses produits de transformation pour alimentation humaine		4	2
Lait frais, lait préparé, lait pasteurisé, préparation à base du lait pour alimentation humaine	0.05		
Fourrages et matières premières des aliments pour animaux, aliments complets et complémentaires pour animaux		20	
Arachides pour transformation industrielle, arachides traitées physiquement avant consommation humaine, préparations pour alimentation humaine		15	8
Noix, amande, cacahuètes, Cajou, noisette, pistache d'Alep, fruits à coque, fruits secs, traitées physiquement avant consommation humaine, préparations pour alimentation humaine.		10	5

2.3.2. L'Acide cyclopiazonique (ACP)

Outre les aflatoxines, certaines espèces d'*Aspergillus* de la section *Flavi* peuvent aussi produire de l'acide cyclopiazonique. Cette toxine peut également être produite par des espèces appartenant au genre *Penicillium*, et notamment *P. camemberti* et *P. cyclopium*.

Cette toxine a pu être mise en évidence dans un certain nombre d'aliments. Cependant, les données concernant cette molécule sont bien moins nombreuses que pour les aflatoxines. La présence souvent conjointe de l'acide cyclopiazonique et des aflatoxines fait que son implication sanitaire est peut-être sous-estimée. Cette hypothèse a notamment été avancée pour expliquer les symptômes

observés pendant la Turkey X disease en Angleterre, pathologie ayant conduit à l'identification des aflatoxines (Cole, 1986).

2.3.2.1 Structure et voie de biosynthèse

L'acide cyclopiazonique (ACP) est un acide indole tétramique de poids moléculaire 336 g/mol (Figure 17).

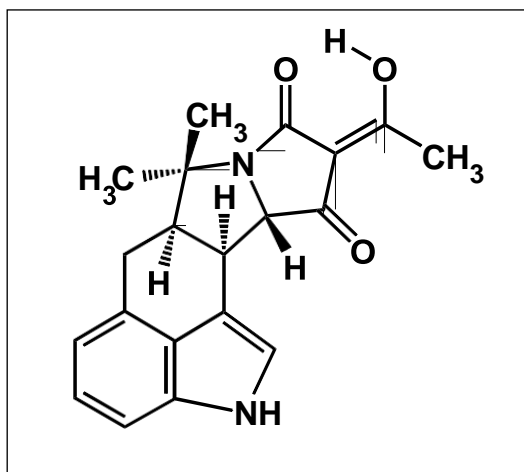


Figure 17 : Structure de l'acide cyclopiazonique

L'acide cyclopiazonique est synthétisé par la voie des acides aminés. Cette toxine dérive du triptophane, du mévalonate et de deux molécules d'acétate (Betina, 1989).

Le cluster de gènes intervenant dans la biosynthèse de l'ACP semble proche du cluster de l'AFB1. Quatre gènes ont été caractérisés par des études de disruption génique (figure 18) :

- *maoA* : qui coderait pour une monoamine synthase
- *dmaT* : qui code pour l'enzyme dimethylallyltryptophane synthase
- *pks-nrps*
- *cftR1* : qui code pour un facteur de transcription. Cependant, la disruption de ce gène n'entraîne pas d'arrêt de la production d'ACP. Il est possible qu'*AflR*, régulateur interne du cluster des aflatoxines agisse aussi comme régulateur du cluster de l'ACP. Ceci permettrait d'expliquer l'apparente co-régulation de la production de ces deux toxines dans certaines

Chez les porcs, une étude a montré que des animaux recevant 10 mg/kg p.c./j d'ACP présentent des troubles à partir de 7 jours d'exposition : faiblesse, inactivité, anorexie, perte de poids. Des diarrhées apparaissent à partir de la deuxième semaine d'exposition. A l'autopsie, les animaux présentaient des lésions hémorragiques intestinales (Lomax *et al.*, 1984).

Chez l'homme, l'ACP est suspect d'être impliqué dans une mycotoxicose aiguë appelée Kodua qui se caractérise par une somnolence, une perte d'équilibre et des troubles nerveux. Elle résulte de la consommation de millet et est observée plus spécifiquement chez les habitants du nord de l'Inde (Rao *et Hussain*, 1985). Il semble que cette toxicose soit liée à la contamination des grains par des souches fongiques d'*A. tamari* Kita, productrices d'ACP.

iii) Toxicité chronique

Dans la plupart des espèces animales, les premiers signes de toxicité chronique associée au CPA sont une diminution de la prise alimentaire et du gain de poids corporel. Ils apparaissent lors d'exposition à des concentrations comprises entre 1 et 5 mg/kg p.c./j.

Il n'existe pas de réglementation concernant les teneurs maximales tolérables en ACP dans les aliments.

2.4– Chémotype des différentes espèces d'*Aspergillus* section *Flavi*

Les différentes espèces de la section *Flavi* n'ont pas forcément la capacité de produire les différentes mycotoxines évoquées précédemment. Le tableau 9 ci-dessous récapitule la nature des toxines pouvant être produites par les différentes espèces de cette section.

En fonction de leurs capacités à produire les différentes aflatoxines et l'acide cyclopiazonique, Vaamonde *et al.* (2003) ont proposé de classer les isolats en différents chémotypes : Chémotype I pour les souches produisant des aflatoxines B et l'ACP, Chémotype II pour les souches produisant des aflatoxines B, G et de l'ACP, Chémotype III pour les isolats produisant des aflatoxines B uniquement, Chémotype IV pour les souches ne produisant que de l'ACP et enfin, Chémotype V pour les souches ne produisant aucune de ces mycotoxines.

Tableau 9 : Capacité des différentes espèces de la section *Flavi* à produire des aflatoxines B, G et de l'acide cyclopiazonique

Espèces	Aflatoxines		ACP	Références
	B	G		
<i>Aspergillus alliaceus</i>	-	-	-	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus arachidicola</i>	+	+	-	Frisvad et al., 2019
<i>Aspergillus aspearensis</i>	-	-	-	Frisvad et al., 2019
<i>Aspergillus austwickii</i>	+	+	+	Frisvad et al., 2019
<i>Aspergillus avenaceus</i>	-	-	-	Frisvad et al., 2019
<i>Aspergillus bertholletius</i>	-	-	+	Frisvad et al., 2019
<i>Aspergillus bombycis</i>	+	+	-	Peterson et al., 2001 Moore et al., 2016
<i>Aspergillus caelatus</i>	-	-	-	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus coremiiformis</i>	-	-	-	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus flavus</i>	+	-	+	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus hancockii</i>	-	-	-	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus korhogoensis</i>	+	+	+	Carvajal-Campos et al., 2017
<i>Aspergillus lanosus</i>	-	-	-	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus leporis</i>	-	-	-	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus minisclerotigenes</i>	+	+	+	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus mottae</i>	+	+	+	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus neoalliaceus</i>	-	-	-	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus nomius</i>	+	+	-	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus novoparasiticus</i>	+	+	-	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus oryzae</i>	-	-	+	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus parasiticus</i>	+	+	-	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus parvisclerotigenus</i>	+	+	+	Frisvad et al., 2005

<i>Aspergillus pipericola</i>	+	+	+	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus pseudocaelatus</i>	+	+	+	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus pseudonomius</i>	+	+	-	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	+	-	+	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus sergii</i>	+	+	+	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus sojae</i>	-	-	-	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus subflavus</i>	-	-	-	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus tamarii</i>	-	-	+	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus texensis</i>	+	+	+	Singh et al., 2018
<i>Aspergillus togoensis</i>	+	-	-	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus transmontanensis</i>	+	+	-	Frisvad, et al., 2019
<i>Aspergillus vandermerwei</i>	-	-	-	Frisvad, et al., 2019

3. LES ASPERGILLUS DE LA SECTION *FLAVI* ET LEURS TOXINES DANS LES DENREES ALIMENTAIRES

Compte tenu de leurs particularités physiologiques, les *Aspergillus* de la section *Flavi* sont des espèces que l'on peut retrouver dans le monde entier. Cependant, leurs températures optimales de développement font que ce sont des contaminants majeurs dans les zones où le climat est relativement chaud. Ainsi, les productions des zones tropicales et subtropicales sont particulièrement « à risque » en ce qui concerne la présence de ces espèces fongiques et de leurs toxines. Compte tenu de l'importance sanitaire des aflatoxines et de l'existence de valeurs seuils dans de nombreux pays, ces toxines font l'objet d'une surveillance régulière dans de nombreux pays/matières premières. Les données disponibles sur la contamination des aliments par l'acide cyclopiazonique sont, elles, beaucoup plus limitées, en lien avec l'absence de réglementation pour cette toxine. De même, les études visant à caractériser la nature des espèces présentes dans les différents aliments sont peu

nombreuses. Ce constat s'explique probablement en partie par la difficulté d'identifier les différentes espèces de la section *Flavi*, ce qui nécessite une grande expertise en mycologie et l'accès à des outils moléculaires pour confirmer les identifications morphologiques. Cependant, la caractérisation des espèces de la section *Flavi* pouvant être retrouvées dans les différents aliments est importante pour l'évaluation du risque associé à cette contamination puisque ces espèces présentent des profils métaboliques et des potentiels toxigènes différents.

Dans cette partie, nous allons présenter les données les plus récentes disponibles concernant la contamination de différentes matières premières et aliments par les aflatoxines et l'acide cyclopiasonique ainsi que les études visant à caractériser la flore fongique.

3.1. Contamination par les aflatoxines

3.1.1. Les céréales

Les céréales représentent la principale source d'exposition de l'homme et des animaux aux aflatoxines car c'est un substrat très favorable à la croissance et à la toxinogénèse (Probst *et al.*, 2010). Elles peuvent être contaminées à plusieurs niveaux (en plein champ ou lors du stockage). En effet, de mauvaises procédures de stockage des produits agricoles peuvent entraîner une ré-humidification des grains et favoriser la toxinogénèse au cours du stockage (Cotty *et al.*, 1997). Depuis la découverte de ces mycotoxines, de très nombreuses études ont visé à caractériser la contamination des céréales, notamment dans les zones géographiques sensibles où elles représentent une part importante de l'alimentation et donc une source majeure d'exposition humaine (Sangare-Tigori *et al.*, 2006; Ok *et al.*, 2007 ; Lahouar *et al.*, 2018), mais aussi animale. Ainsi, la mise en évidence d'une contamination des céréales au Kenya précède souvent des flambées d'aflatoxicose (Probst *et al.*, 2010). Dans ce manuscrit ne seront présentées que les études les plus récentes. Ainsi, le Tableau 10 récapitule les résultats des enquêtes publiées depuis 2013.

En Europe, il était classiquement admis que les productions étaient indemnes de ces toxines. Cependant, depuis quelques années, les alertes rapportant une contamination des céréales européennes par les aflatoxines se sont multipliées (Bailly *et al.*, 2018 ; Riba *et al.*, 2010 ; Tabuc *et al.*, 2009 ; Villa *et al.*, 2009). Il est probable que les modifications climatiques globales soient responsables de l'émergence de ces contaminants dans les pays européens (Giorni *et al.*, 2007). Des études récentes

visant à modéliser l'évolution de la contamination par les aflatoxines en fonction des changements climatiques montrent que, dans les années qui viennent, le réchauffement global va entraîner un risque majeur de contamination des productions du sud de l'Europe (dont la France) par ces molécules (Battilani *et al.*, 2016).

Tableau 10 : Occurrence de l'AFB1 dans le maïs et les denrées alimentaires à base de maïs en Europe, Amérique, Asie de l'Est et Afrique rapportées depuis 2013.

Région	Pays	Denrée	Nb d'échantillons AFB1+/total (% d'éch. contaminés)	Échantillons dépassant les normes EU	Niveau de contamination	Références
Europe	Italie	Farine de maïs	13/50 (26%)	0 >5 ppb	0,17-3,75 µg/kg	(Armorini <i>et al.</i> , 2015)
	Turquie	Farine de maïs	16/24 (66,7%)	0 >5 ppb	0,41-1,12 µg/kg	(Kara <i>et al.</i> , 2015)
	Serbie	Maïs	137/200 (68,5%)	107 (53,5%) >5 ppb	1,01-86,1 µg/kg	(Kos <i>et al.</i> , 2013)
	Serbie	Farine de maïs	27/56 (48,2%)	5 (8,9%) >5ppb	0,53-8,8 µg/kg	(Torovic, 2018)
	Croatie	Maïs	305/972 (31,4%)	211 (21,7%) >5 ppb	1,1-2072 µg/kg	(Pildain <i>et al.</i> , 2015, 2014)
Amérique	Brésil	Maïs	9/16 (56%)	7(44%) >20ppb	10.23- 191.63 µg/kg	(Viaro <i>et al.</i> , 2017)
Asie de l'Est	Chine	Maïs (fourrage)	68/98 (69%)	35 (17,3%) >20 ppb	2-300 µg/kg	(Liu <i>et al.</i> , 2016)
	Corée	Mais	0/507 (0%)	-	-	(Kim <i>et al.</i> , 2017)
	Inde	Maïs	25/45 (55,5%)	19 (42,2%) >5 ppb	20,6-402,4 µg/kg	(Mohana <i>et al.</i> , 2014)
Afrique	Malawi	Chips à base de maïs	9/12 (75%)	9 (75%) >5 ppb	0,1-1,4 µg/kg	(Matumba <i>et al.</i> , 2014)
		Préparation pour les enfants	36/36 (100%)	36 (100%) >0,1 ppb	0,5-5,2 µg/kg	
	Afrique du Sud	Maïs	9/54 (16,6%)	3 (5,5%) >5 ppb	1-73 µg/kg	(Mngqawa <i>et al.</i> , 2016)
	Nigeria	Maïs	50/120 (41,6%)	0 (0%) >5 ppb	0,14-0,22 µg/kg	(Okeke <i>et al.</i> , 2015)
	Tunisie	Maïs	(18/21) 85,7%	4 (19%) >5ppb	8.46-165.17 µg/kg	(Jedidi <i>et al.</i> 2017)

3.1.2 Fruits à coque et fruits secs

Les fruits à coque font partie des aliments qui peuvent être contaminés par les aflatoxines.

Les arachides et les pistaches sont les plus étudiées car elles sont un substrat favorable pour la croissance et la toxinogénèse. La contamination par l'AFB1 est un problème important aux États-Unis, en Asie et en Afrique (Bhatnagar *et al.*, 2004; Bonjar, 2004; Chala *et al.*, 2013).

Une étude montre que la contamination des pistaches par les aflatoxines peut avoir lieu à toutes les étapes de la chaîne de production (récolte, entreposage et stockage) (Georgiadou *et al.*, 2012). De ce fait, les niveaux de contamination par les aflatoxines sont parfois très élevés, allant de 11 à 1361 µg/kg à la cueillette à 650 à 1100 µg/kg après stockage (Georgiadou *et al.*, 2012). Les données les plus récentes concernant la contamination de ces produits par les aflatoxines sont récapitulées dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Présence des aflatoxines dans les fruits à coque et les fruits secs

Pays	Produit	Nombre d'échantillons	Toxine	Niveau de contamination (µg/Kg)	% échantillons positifs	Référence
Algérie	Arachide	49	AFB1 AFB2	LOD-174 10-193	57,14 4	(Mimoune <i>et al.</i> , 2018)
	Amande	30	AFB1 AFB2	LOD- 6.62 0.18-0.65	53.3 30	
	Figue	33	AFB1 AFB2	0.22- 83.4 0.7	75.7 3	
	Pistache	31	AFs	0.4-0.7	64.5	(Fernane <i>et al.</i> , 2010)
Arabie Saoudite	Amande		AFs	38-45	40	(Deabes et Al- Habib., 2011)
Chine	Arachide	1040	AFB1	0,01-720	25	(Ding <i>et al.</i> , 2012)

Corée du Sud	Noix	1	AF totales	7,89	100	(Chun <i>et al.</i> , 2007)
Egypt	Amande		AFB1	ND	0	(Galal <i>et al.</i> , 2017)
Espagne	Figue sèche	49	AFs	0.62		(Cano-Sancho <i>et al.</i> , 2013).
Ethiopie	Arachide	120	AFs	15-11900	77,5	(Chala <i>et al.</i> , 2013)
Grèce	Pistache	80	AFs	11- 1361	78	(Georgiadou <i>et al.</i> , 2012)
Iran	Amande	25	AFs	0-6	96.5	(Rezaei <i>et al.</i> 2014) (Hedayti <i>et al.</i> , 2016)
	Figue	30				
	Noisette	25				
	Noix	40				
	Pistache	40				
	Sunflower	40				
Iran	Arachide pure	23	AFs	0-31.7	17.3	(Ostadrahimi <i>et al.</i> , 2014)
	Arachide	33		0-51.7	15.15	
	Noix pure	43		0-38.1	90.69	
	Pistache pure	43		0-2.08	2.3	(Hedayti <i>et al.</i> , 2016)
	Pistache	29		0-52.3	55.17	
Iran	Abricot	4	AFs		25	(Shadbad <i>et al.</i> 2012)
	Amande	35			14.29	
	Arachide	6			33.33	
	Grains de sésame	6		-	0	
	Noix	26			76.92	
	Noix de Cajou	14			14.29	
	Noisette	13			7.69	
	Pistache	32			53.13	

Iran	Pistache	3356	AFB1	7.3-53.2	85	(Cheraghali <i>et al.</i> , 2007)
Maroc	Figues sèches	20	AFs	0,28-32,9	30	(Juan <i>et al.</i> , 2008)
	Noix	20	AFB1	0,56 -2500	30	
			AFs	1,24 -4320	30	
Raisins secs	20	AFB1	3,2 – 13,9	20		
Portugal	Amandes	21	AFB1	4,8	4,8	(Rodrigues <i>et al.</i> , 2012)
			AFB2	0,17	4,8	
Qatar	Pistaches	6	AFs	0,23-81,6	50	(Abdulka-dar <i>et al.</i> , 2004)
	Arachides	4	AFs	0,17-2,13	66,7	
	Figues sèches	6	AFs	0,7-11,8	50	

3.1.3. Les épices

La présence d'aflatoxines dans les épices a fait l'objet de nombreuses études. En effet, la contamination par les aflatoxines est possible et fréquente car :

- De nombreuses épices sont produites dans des pays ayant un climat tropical ou subtropical et dont les conditions climatiques (température, humidité et précipitations) sont favorables au développement fongique (Mandee *et al.*, 2005)
- Les conditions de récolte/préparation/transformation de ces condiments peuvent permettre la contamination par les espèces aflatoxinogènes (séchage au sol par exemple) et leur développement ainsi que la toxinogénèse (séchage lent au soleil).

Les résultats d'études réalisées sur la contamination des épices et publiées au cours des dernières années sont récapitulés dans le Tableau 12. L'importance des épices dans la tradition culinaire de nombreux pays explique l'intérêt porté à la qualité sanitaire de ces aliments et le nombre important d'études disponibles.

Tableau 12 : Présence des aflatoxines dans les épices.

Épices	Origine géographique	Nombre d'échantillons	Toxine	Niveau de contamination ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	% échantillons positifs	Références
Cannelle	Iran	9	AFs	-	-	(Khazaeli <i>et al.</i> , 2017)
Chilli	Italie	11	AFB1	5-27	45.45	(Ramagnoli <i>et al.</i> 2007)
	Inde	182	AFB1	<10-969	58.8	(Reddy <i>et al.</i> , 2001)
Chilli	Malaysia	8	AFB1	0.58-3.5	100	(Reddy <i>et al.</i> , 2011)
	Pakistan	85	AFs	<0.05- 95.90	72	(Iqbal <i>et al.</i> , 2010)
	Turquie	35	AFs	0.5-2.49	35	(Santos <i>et al.</i> , 2010)
			OTA	0.62- 44.6	100	
ZEA	10- 129	46				
Chilli entier	Pakistan	22	AFB1	<LOD- 96.3	73	(Iqbal <i>et al.</i> , 2010)
	Pakistan	22	AFB1	<LOD- 89.6	86	(Iqbal <i>et al.</i> , 2010)
	Turquie	15	AFs	1.8-85.9	100	(Bircan <i>et al.</i> , 2005)
Chilli sec	WEST AFRICA	30	AFs	3.2	3	(Hell <i>et al.</i> , 2009)
	Pakistan	13	AFs	0.1-96.2	100	(Peterson., 2007)
	Malaysia	80	AFB1	0.2-54.61	65	(Jalili <i>et Jinap.</i> , 2012)
			AFs	0.2-79.7	65	
Cumin	Iran	16	AFS	-	0	(Khazaeli <i>et al.</i> , 2017)
	Maroc	14	AFB1	0,03	57	(Zinedine <i>et al.</i> , 2006)
			AFs	0,05	57	
Curcuma	Iran	10	AFB1	1.3- 4.2	80	(Khazaeli <i>et al.</i> , 2017)
Curry	Corée	20	AFB1	0.13–0.46	10	(Cho <i>et al.</i> , 2008)
Farine de piment rouge	Corée	41	AFB1	0.08–4.66	17,1	
Fenouille	Iran	9	AFs	-	-	(Khazaeli <i>et al.</i> , 2017)

Gingembre	Maroc	12	AFB1	0,63	86	Zinedine <i>et al.</i> , 2006)
			AFs	1,47	86	
	Corée	7	AFB1	0.18	14,3	(Cho <i>et al.</i> , 2008)
	Iran	9	AFB1	1.9-39.8	55	(Khazaeli <i>et al.</i> , 2017)
ISOT (Piment noir Kurde)	Turquie	75	AFB1	0.11- 24.7	96	(Ardic <i>et al.</i> , 2008)
Paprika	Maroc	14	AFB1	2,88	100	(Zinedine <i>et al.</i> , 2006)
			AFs	5,23	100	
	Brésil	70	AFB1	0,5-7,3	61,4	(Shundo <i>et al.</i> , 2009a)
Paprika	Espagne	21	AFB1	0.7-3.8	90	(Hierro <i>et al.</i> , 2008)
			OTA	0.7-73.8	71	
	Espagne	64	AFs	0.5-7.25	59	(Santos <i>et al.</i> , 2010)
			OTA	0.1-281	98	
			ZEA	10-131	39	
	Tunisie	23	OTA	31-528	70	(Zaied <i>et al.</i> , 2010)
	Turquie	30	AFs	0.5-124.6	90	(Bircan <i>et al.</i> , 2005)
		23	AFs	0.38-14.71	83	(Bircan <i>et al.</i> , 2008)
Piment rouge émietté	Turquie	75	AFB1	N.D. – 9.46	n.r.	(Kursun <i>et Multu</i> 2010)
Piment rouge en poudre	Corée	192	OTA	<0.2-35	22	(Ahn <i>et al.</i> , 2010)
Piment pili pili	Turquie	30	AFB1	1,9-35,5	43,3	(Colak <i>et al.</i> , 2006)
			AFs	0,7-46,8	56,7	
Piment rouge	Turquie	34	AFs	3.55-9.55	100	(Kursun <i>et Multu</i> 2010)
	Turquie	50	AFB1	1.48-70.05	100	(Kanbur <i>et al.</i> , 2006)
	Arabie Saoudite	5	STC	11-25	60	(Bokhari <i>et al.</i> , 2007)
	Iran	10	AFB1	15.5-57.5	100	(Khazaeli <i>et al.</i> 2017)
	Turquie	100	AFB1	0,25-5	50	(Aydin <i>et al.</i> , 2007)

		30	AFB1	2,9-11,2	20	(Colak <i>et al.</i> , 2006)
			AFs	0,8-15,4	36,7	
Poivre noir	Corée	2	AFB1	ND	0	(Cho <i>et al.</i> , 2008)
	Iran	7	AFB1	0.7-8.4	71	(Khazaeli <i>et al.</i> , 2017)
	Maroc	15	AFB1	0,09	47	(Zinedine <i>et al.</i> , 2006)
			AFs	0,21	93	
	Turquie	24	AFB1	9,8-10,3	8,3	(Colak <i>et al.</i> , 2006)
			AFs	0,3-16,7	33,3	
Pâte de pigment rouge	Corée	15	AFB1	0.18–0.21	13,3	(Cho <i>et al.</i> , 2008)
			AFs	0.21–0.55	13,3	

ND non détectable

3.2. Contamination par l'acide cyclopiazonique

L'importance sanitaire de l'acide cyclopiazonique (ACP) a été évoquée à l'occasion de la Turkey X disease, accident toxique aigu survenu sur des dindonneaux en Angleterre et ayant permis la caractérisation des aflatoxines. En effet, les reproductions expérimentales de l'intoxication en utilisant des aflatoxines seules n'ont pas permis de reproduire parfaitement les signes cliniques observés dans la Turkey X disease. Il a alors été envisagé que la présence d'ACP dans les aliments responsables pouvait peut-être expliquer ces différences (Cole *et al.*, 1986).

Cependant, les études toxicologiques menées sur l'ACP ayant montré une toxicité aiguë plus faible que les aflatoxines, cette molécule n'a été depuis que relativement peu étudiée quant à sa présence comme contaminant alimentaire.

Les rares études disponibles montrent qu'il est possible de trouver de l'ACP dans les cacahuètes (Landsen et Davidson., 1983; Mphande *et al.*, 2004), le maïs (Balachandran *et al.*, 1996 ; Maragos *et al.*, 2017) et d'autres productions végétales pouvant être contaminées par les *Aspergillus* de la section *Flavi* (Balachandran *et al.*, 1996). Les niveaux de contamination observés sont variables mais sont généralement de quelques dizaines de µg/kg d'aliment. Dans certains cas, elles peuvent atteindre plusieurs

mg/kg. La fréquence relativement importante de co-contamination des aliments par les aflatoxines et l'ACP (Balachandran *et al.*, 1996 ; Fernandez-Pinto *et al.*, 2001) justifierait probablement des études de toxicités visant à évaluer les effets possibles de ce mélange de toxines (effets synergiques ou antagonistes).

Il convient aussi de souligner que l'ACP pouvant aussi être produit par certaines espèces de *Penicillium*, cette toxine peut être retrouvées dans d'autres aliments et en particulier dans les fromages à croute fleurie, le *Penicillium camemberti* utilisé dans ce type de fabrication pouvant produire ce composé (Le Bars., 1990; Garcia-Rico *et al.*, 2017).

3.3. Contamination par les *Aspergillus* section *Flavi*

L'analyse de la flore fongique des aliments permet d'apporter des informations importantes en santé publique. En effet, la connaissance de la mycoflore susceptible de contaminer différents aliments peut permettre :

- De mieux évaluer le risque de contamination mycotoxique
- De mettre en évidence une distribution géographique particulière de certaines espèces ou une prédilection de substrat.
- En fonction des particularités éco-physiologique des espèces présentes, de comprendre l'origine des contaminations et leur impact possible sur la salubrité et la sécurité des aliments.

Toutefois, il s'agit d'analyses difficiles car elles nécessitent une grande expertise pour arriver à isoler et identifier les différents isolats présents au stade d'espèce.

En ce qui concerne spécifiquement les *Aspergillus* section *Flavi*, la mise en évidence de nouvelles espèces, disposant d'un profil métabolique spécifique et capable de produire différentes toxines, justifie que l'on s'attache à identifier la nature des espèces fongiques présentes dans les différentes matières premières.

Au cours des dernières années, un certain nombre d'enquêtes ont ainsi visé à caractériser la présence d'espèces de la section *Flavi* dans différents substrats alimentaires. Elles ont aussi, en général, visé à étudier le potentiel toxigène des différentes espèces identifiées (Tableau 13).

Tableau13 : présence et potentiel toxigène des *Aspergillus* section *Flavi* dans les aliments

Pays	Aliment	Nombre d'échantillons	Nombre des souches d' <i>Aspergillus Flavi</i> étudiées	Fréquence de contamination par des espèces de la section <i>Flavi</i>	Nature des espèces présentes	Production de mycotoxines	Référence
Algérie	Amande	30	203	50%	<i>A.flavus</i> (181 souches) <i>A.tamarii</i> (11 souches) <i>A.parasiticus</i> (2 souches) <i>A.oryzae</i> (9 souches)	AFB1/AFB2	(Mimoune <i>et al.</i> , 2018)
	Arachide	49					
	Figue	33					
Argentine	Arachide				<i>A.arachidicola</i>	AFB/AFG/acide asperigillique, acide kojic	(Viaro <i>et al.</i> , 2017)
					<i>A.avenaceus</i>	Non productrices	
					<i>A.bombycis</i>	AFB/AFG/ACP /acide asperigillique, acide kojic (+/_)	
					<i>A.caelatus</i>	AFB/ACP	
					<i>A.flavus</i>	AFB/ACP /acide asperigillique (+/_), acide kojic	
					<i>A.leporis</i>	AFB	
Argentine	Arachide				<i>A.minisclerotigenes</i>	AFB/AFG/acide asperigillique, acide kojique	Viaro <i>et al.</i> , 2017)
					<i>A.nomius</i>	AFB/AFG/acide asperigillique, acide kojique	
					<i>A.parasiticus</i>	AFB/AFG/acide asperigillique, acide kojique	
					<i>A.parvisclerotigenus</i>	AFB/AFG/ACP /acide asperigillique, acide kojique	
					<i>A.pseudotamarii</i>	AFB/ACP/, acide kojique	
					<i>A.tamarii</i>	AFB/ACP(+/_)	
Argentine	Arachide				<i>A.pseudocaelatus</i>	AFB/AFG/ACP	(Varga <i>et al.</i> , 2011)

Argentine	Arachide		67souches	56% (37 isolats) 44.8% (30 isolats)	<i>A.flavus</i> <i>A.parasiticus</i>	AFB/CPA AFB/AFG	Vaamond et al.,2003
Brésil	Riz	187	47	13.4%	<i>A.flavus</i> <i>A. pseudocaelatus</i> <i>A. caelatus</i> <i>A. novoparasiticus</i> <i>A arachidicola</i>	AFB/ACP/Acide Kojique AFB/AFG/acide kojique Acide kojique AFB/AFG/acide kojique AFB/AFG/ACP /acide Kojique	(Katsurayama et al., 2018)
Brésil	Arachide	119	556 souches	11 (2%) 515(92.6%) 17 (3%) 13(2.4%)	<i>A. caelatus</i> <i>A. flavus</i> <i>A.parasiticus</i> <i>A.tamaritii</i>	Non Productrices AFB/ACP AFB/AFG Non analysees	(L.M. Martins et al., 2017)
Brésil	nut	20	241 isolats dont 81 étudiées	41%	<i>A. flavus</i> (24souches) <i>A.nomius</i> (19) <i>A. tamaritii</i> (17) <i>A. caelatus</i> (15) <i>A.bombycis</i> (2) <i>A. arachidicola</i> (1)	AFB1/AFB2 AFB1/AFG1 NP NP AFB1/AFG1 AFB1	(Gonçalves et al., 2008 ; Taniwakia et Pitt 2013)
Chine	Blé	32		5.6%		AFB1	(Zhao et al., 2017)
	Produits à base de Blé	146					
Maroc	Epices	80 echantillons		80%	<i>A. flavus</i> <i>A. minisclerotigenes</i>	AFB/ACP AFB/AFG/ACP	(El Maghubi et al., 2013)
Nigeria	Arachide				<i>A.parvisclerotigenus</i>	AFB/AFG/ACP	(Frisvad et al., 2005)

Portugal	Amande		22 isolats	2 (9.1%) 6 (27.3%) 4 (18.2%) 2 (9.1%) 2 (9.1%) 6 (27.3%)	<i>A.flavus</i> <i>A. minisclerotigenes</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. mottae</i> <i>A.sergii</i> <i>A. transmontanensis</i>	AFB/AFG AFB/AFG/ACP AFB/AFG/ACP AFB/AFG/ACP AFB/AFG/ACP AFB/AFG	(Soares <i>et al.</i> , 2011)
	Mais				<i>A.mottae</i>	AFB/AFG/ACP (+/_)	
Qatar	Epices	120	30	30%	<i>A.flavus</i> <i>A.tamarii</i>	AFB AFB/AFG	(Hammami <i>et al.</i> , 2014)
Tunisie	Maïs	21	16	66.67% 9.52%	<i>A.flavus</i> <i>A.parasiticus</i>	AFB AFB/AFG	(Jedidi <i>et al.</i> , 2017)
Tunisie	blé	22	11	50%	<i>A.flavus</i>	Non productrices	(Jedidi <i>et al.</i> , 2017)
Tunisie	barely	20	12	60%	<i>A.flavus</i>	Non productrices	(Jedidi <i>et al.</i> , 2017)
	Arachide			17%	<i>A.flavus</i>		(Gonzalez <i>et al.</i> , 2008)

SECONDE PARTIE : TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

1- OBJECTIFS

Les *Aspergillus* de la section *Flavi* sont donc des contaminants fréquents de nombreuses productions destinées à l'alimentation humaine et animale. Leur développement dans les matières premières peut entraîner l'accumulation de composés toxiques dont la nature dépendra des espèces fongiques présentes.

A l'heure actuelle, il n'y pas de données disponibles concernant la nature des espèces fongiques susceptibles de contaminer les produits commercialisés au Liban.

L'objectif de nos travaux était donc de caractériser la flore fongique de différents produits sensibles à la contamination par les *Aspergillus* section *Flavi* (épices, céréales, fruits secs) et de caractériser avec précision la nature des espèces fongiques présentes, afin de fournir des éléments importants pour l'évaluation du risque sanitaire associé.

Pour cela, les souches de la section *Flavi* présentes dans les échantillons analysés ont été isolées puis caractérisées sur les plans morphologique, moléculaire et métabolique.

2- MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Solvants et réactifs

Tous les solvants et réactifs ont été achetés chez VWR international (Fontenay sous-bois, France) et correspondaient à une qualité HPLC. Les milieux de cultures ont été achetés chez Biokar (Al- lonne, France) et le Tween chez Merck (Darmstadt, Allemagne). Les standards des mycotoxines ont été obtenus auprès de Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). Les standards ont été dilués dans un mélange toluène-acétonitrile (98 :2) pour l'AFB1 et dans du méthanol pour l'ACP afin d'obtenir des solutions mères à une concentration de 200 µg/ml. Ces solutions ont été stockées à - 20°C. L'ADN Taq polymérase utilisée pour la réalisation de l'identification moléculaire a été achetée de chez l'Invitrogen (Carlsbad, Ca, USA)

2.2. Échantillonnage

Les différents échantillons d'épices, de céréales et de fruits secs ont été choisis selon la fréquence de leurs consommations ainsi que leurs disponibilités au Liban. Au total, 120 échantillons (80 échantillons d'épices, 20 de céréales et 20 de fruits secs) ont été prélevés sur l'ensemble du territoire libanais (Figures 19 et 20). Ces échantillons ont été choisis de qualité « commerciale », c'est- à-dire qu'aucun échantillon macroscopiquement moisi n'a été prélevé.

2.2.1. Épices

Quatorze types d'épices différents ont été analysés : anis (n = 6), kaak al bhar (n = 5), cumin (n = 7), chili (n = 7), cannelle (n = 5), coriandre (n = 6), cumin (n = 5), curry (n = 7), gingembre (n = 5), noix de muscade (n = 6), poivre noir (n = 6), poivre blanc (n = 5), poivre Libanais (n = 5), curcuma (n = 5). La plupart des échantillons prélevés étaient stockés chez les commerçants dans des récipients en plastique sans aucune protection particulière (63 sur 80 des échantillons). Cependant, certains d'entre eux étaient conditionnés (emballage dans des sacs en plastique hermétiquement clos) avant leur mise sur le marché (17 échantillons dont bhar al kaak (n = 2) ; cumin (n = 3) ; poivre noir (n = 2) ; curry (n = 2) ; gingembre (n = 2) ; noix de muscade (n = 2) ; poivre Libanais (n = 2) et le curcuma (n = 2)).

Pour chaque échantillon, environ 100 grammes ont été collectés et placés dans des boîtes stériles ou dans des tubes en plastique. Ils ont été conservés à 4°C jusqu'à analyse. Avant la réalisation

des examens mycologiques, les épices présents sous forme de graines ont été finement broyées à l'aide de Waring Blender (Waring Laboratory, Torrington, CT, USA).

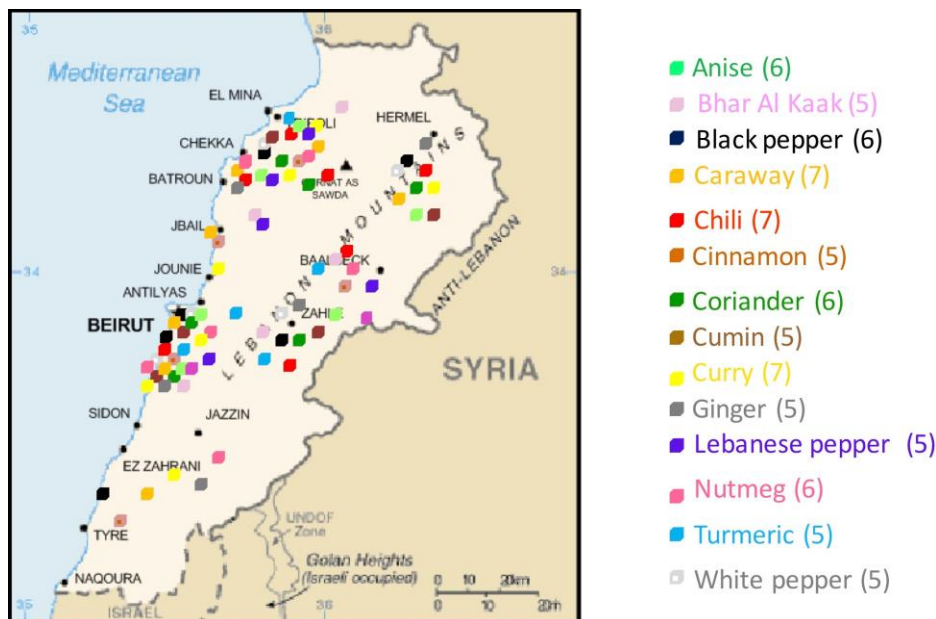


Figure 19 : Zones de collecte des différents échantillons d'épices
Le nombre entre parenthèse indique le nombre total d'échantillons prélevés.

2.2.2. Céréales et fruits secs

En ce qui concerne les céréales et les fruits secs, 40 échantillons ont été collectés : maïs (n=9), blé (n=9), arachides (n=6), amandes (n=5), noix (n=5), raisins secs (n=3), orge (n=2), son de blé (n=2), châtaignes (n=1).

Pour les céréales, 3 échantillons (maïs, orge, son de blé) étaient à destination de l'alimentation animale alors que les 17 autres étaient destinés à l'alimentation humaine.

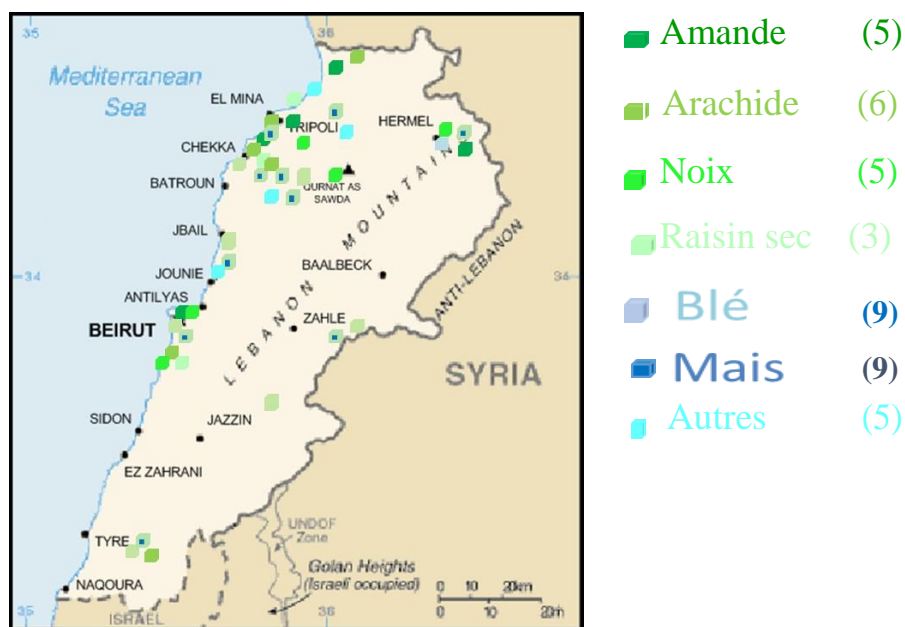


Figure 20 : zones de collecte des différents échantillons de céréales et de fruits secs
Le nombre entre parenthèse indique le nombre total d'échantillons prélevés.

2.3. Énumération et identification fongique

La numération fongique a été réalisée en suivant les recommandations de la norme ISO 7954. Pour cela, 20 grammes d'échantillon ont été mélangés à 180 ml de tween 80 à 0,05% pendant 2 minutes dans un Waring Blender puis l'ensemble a été placé sur une table d'agitation horizontale réglée à 220 tours par minute. Ensuite, des dilutions décimales ont été préparées en utilisant du tween 0,05%. Cent µl de chaque dilution ont étéensemencés par étalement en surface d'une boîte de Pétri contenant du milieu Malt Agar (MEA), ainsi que sur une boîte contenant du milieu malt salé (MEA + 6% NaCl). Ce dernier milieu est utilisé pour identifier les espèces xérophiles et pour limiter la croissance des espèces envahissantes comme les mucorales qui peuvent gêner la réalisation d'une numération correcte.

La numération des colonies a été réalisée après 3 jours d'incubation à 25°C et confirmée après 5j. La limite de détection d'une espèce fongique dans les conditions expérimentales utilisées est de 10 CFU/g d'échantillon. Les colonies ont été identifiées au niveau du genre fongique et, pour

certaines, de l'espèce en utilisant les classifications de Pitt *et* Hocking (2009) et de Samson *et* coll. (2010). Les isolats correspondant à des espèces de la section *Flavi* ont alors été isolés par réalisation de repiquages successifs sur milieu MEA et Malt salé jusqu'à obtention d'une souche pure. Ces colonies développent généralement une teinte verte sur MEA. La coloration est plus ou moins marquée en fonction de l'importance de la sporulation, de l'abondance d'un mycélium aérien stérile ainsi que de la présence de sclérotés foncés. Au niveau microscopique, les conidiophores sont longs, incolores plus ou moins rugueux et portent la plupart du temps de belles têtes radiées au $\frac{3}{4}$. De petites têtes en colonnes sont possibles notamment dans le mycélium aérien. Les vésicules sont plus ou moins globuleuses, portent 1 ou 2 rangées de stérigmates (tête Uni ou Bisériée). Les conidies sont globuleuses plus ou moins ornementées. Les sclérotés sont possibles, plus ou moins grosses et la plupart du temps foncées à maturation.

2.4. Caractérisation des souches d'*Aspergillus* de la section *Flavi*

2.4.1. Identification morphologique

Les souches appartenant à la section *Flavi* ont été identifiées au niveau de l'espèce par un examen macro- et microscopique réalisé après 5 et 7 jours de culture à 25°C sur milieux MEA, CREA (Creatine sucrose agar: 3.0 g creatine, 30 g sucrose, 0.5 g KCl, 0.5 g MgSO₄.7H₂O, 0.5 g FeSO₄.7H₂O, 1.3 g K₂HPO₄.3H₂O, 0.05 g Bromocresol purple, 15.0 g agar, eau distillée qsp 1 litre) et sur milieu AFPA (Thermo-Fisher Diagnostics, Dardilly, France) comme décrit par Pitt *et* coll. (1983) et Varga *et* coll. (2011). Le milieu CREA est utilisé pour révéler la production d'acides organiques (acide citrique, acide lactique, acide maltique...). En effet, le pourpre de bromocrésol présent dans le milieu change de couleur avec le pH. Il devient jaune lors de l'acidification. Le milieu AFPA révèle lui la production d'acide aspergillique ou nor-aspergillique. Ces acides, lorsqu'ils sont produits, réagissent avec le citrate d'ammonium ferrique pour former un complexe coloré orangé. Le comportement des différentes espèces de la section *Flavi* sur milieu AFPA est récapitulé dans le Tableau 14 ci-dessous.

Tableau 14 : Production d'acide aspergillique par différentes espèces de la section *Flavi*

	Acide aspergillique	Revers AFPA	Référence
<i>A. alliaceus</i>	-	Crème	(Laakso <i>et al.</i> , 1994)
<i>A. arachidicola</i>	+	Orange	(Pildain <i>et al.</i> , 2008)
<i>A. avenaceus</i>	-	Crème	(Varga <i>et al.</i> , 2011)
<i>A. bertholletius</i>	-	Crème	(Frisvad <i>et al.</i> , 2012)
<i>A. bombycis</i>	+	Orange	(Varga <i>et al.</i> , 2011)
<i>A. caelatus</i>	-	Crème	(Pildain <i>et al.</i> , 2008; Varga <i>et al.</i> , 2011)
<i>A. coremiformis</i>	-	Crème	(Varga <i>et al.</i> , 2011)
<i>A. flavus</i>	+	Orange	(White <i>et al.</i> , 1943; Varga <i>et al.</i> , 2011)
<i>A. hancockii</i>	-	Crème	(Pitt <i>et al.</i> , 2017)
<i>A. korhogoensis</i>	+	Orange	(Carvajal <i>et al.</i> , 2017)
<i>A. lanosus</i>	-	Crème	(Frisvad et Samson., 2000)
<i>A. leporis</i>	-	Crème	(Frisvad et Samson., 2000)
<i>A. minisclerotigenes</i>	+	Orange	(Pildain <i>et al.</i> , 2008)
<i>A. mottae</i>	+	Orange	(Soares <i>et al.</i> , 2012)
<i>A. nomius</i>	+	Orange	(Frisvad et Samson., 2000)
<i>A. novoparasiticus</i>	-	Crème	(Gonçalves <i>et al.</i> , 2011)
<i>A. oryzae</i>	-	Crème	(Varga <i>et al.</i> , 2011)
<i>A. parasiticus</i>	+	Orange	(Assante <i>et al.</i> , 1981)
<i>A. parvisclerotigenus</i>	- / +	Crème / Orange	(Frisvad <i>et al.</i> , 2005; Varga <i>et al.</i> , 2011)
<i>A. pseudocaelatus</i>	-	Crème	(Varga <i>et al.</i> , 2011)
<i>A. pseudonomius</i>	-	Crème	(Varga <i>et al.</i> , 2011)

<i>A. pseudotamarii</i>	-	Brun	(Ito et al., 2001 ; Varga et al., 2011)
<i>A. sergii</i>	+	Orange	(Soares et al., 2012)
<i>A. sojae</i>	+	Orange	(Pildain et al., 2008)
<i>A. tamarii</i>	-	Brun	(Varga et al., 2011)
<i>A. togoensis</i>	-	Crème	(Rank et al., 2011)
<i>A. transmontanensis</i>	+	Orange	(Soares et al., 2012)

A l'issue de cette étape, toutes les souches dont les caractéristiques morphologiques ne correspondaient pas à l'espèce *A. flavus* ont fait l'objet d'une caractérisation moléculaire.

2.4.2. *Identification moléculaire*

L'identification moléculaire des souches de la section *Flavi* ne présentant pas les aspects morphologiques typiques d'*A. flavus* a été réalisée par séquençage de la région ITS. Elle a ensuite été complétée, pour certaines souches atypiques par le séquençage de la bêta-tubuline et de la calmoduline.

Pour cela, les souches ont été cultivées pendant 3 jours à 27°C en milieu liquide YES (Yeast Extract Sucrose) dans un incubateur rotatif réglé à 160 tours par minute. L'ADN génomique a été extrait comme décrit précédemment par Adjovi *et al.* (2014).

Les amorces utilisées pour l'identification moléculaire des souches sont décrites dans le Tableau 15 ci-dessous.

Tableau 15 : Séquences des amorces utilisées pour l'identification moléculaire des souches de la section *Flavi*.

Gene	Nom du gène	Longueurbp	Primers		Sequence (Nucleotides : 5'→ 3')
			Forward	Reverse	
ITS (1-2)	18S ribosomal RNA gene partial se- quence Inter- nal Tran- scribed spacer	565-613	ITS1		5' - GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG
				ITS 2	5' - TTGGTCCGTGTTTCAAGACG
ITS (4-5)		300-330	ITS5		5' - GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
				ITS 4	5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC
benA	β -tubulin	1125	β-tub 2a		5' - GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC
				β-tub 2b	5' - ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC
<i>cmdA</i>	calmodulin	543	Cmd5		5' – CCGAGTACAAGGAGGCCTTC-3'
				Cmd6	5' – CCGATAGAGGTCATAACGTGG-3'

L'amplification des séquences d'intérêt a été réalisée par PCR en utilisant un thermocycleur GeneAmp PCR 2700 (Applied biosystems, Foster city, USA). Ensuite, les produits issus de la PCR ont été purifiés en utilisant un kit GenElute PCR Clean up kit (Sigma Aldrich) puis séquencés sur un séquenceur AB1313 (Applied biosystems) par la méthode du colorant terminal. Les produits ont été séquencés dans les deux sens.

2.4.3. *Détermination du potentiel toxigène des souches*

Pour tester la capacité des souches à produire différentes mycotoxines, une suspension de spores a été réalisée à partir d'une culture de 7 jours de chacune des souches isolées. Cent spores ont ensuite été inoculées en point central sur milieu MEA et incubées 7 jours à 25°C. Après ce délai, les souches ont été testées quant à leur capacité à produire les différentes aflatoxines et l'acide cyclopiazonique. Les toxines ont, dans un premier temps été mesurées par chromatographie planaire. Ensuite, ces résultats ont été confirmés par analyse HPLC.

- *Extraction des toxines*

Les toxines ont été extraites du milieu de culture par agitation pendant 4h dans un solvant approprié. Les aflatoxines ont été extraites par le chloroforme alors que l'acide cyclopiazonique a été extrait après acidification du milieu par un mélange méthanol-chloroforme (1 :1 v/v) comme décrit précédemment par El Maghubi *et al.* (2013). Ensuite, les extraits ont été filtrés sur filtre séparateur de phase (Whatman PS1) et le filtrat a été évaporé à sec par application d'un flux doux d'air.

- *Quantification des aflatoxines par chromatographie planaire*

La quantification des aflatoxines par chromatographie planaire a été réalisée comme précédemment décrit par Shotwel *et al.* (1981). Les extraits secs ont été dissous dans un mélange toluène-acétonitrile (98 :2 v/v). Ils ont ensuite été séparés par migration sur une plaque de silice (Merck) dans un bain constitué par un mélange éther-méthanol-eau (96 :3 :1 v/v/v). Les toxines ont ensuite été quantifiées par fluorodensitométrie à la longueur d'onde 365 nm en utilisant un fluorodensitomètre Shimadzu CS930 (Shimadzu corp., Kyoto, Japon). La quantification des aflatoxines a été réalisée par comparaison avec une gamme de standards des différentes aflatoxines déposée sur la même plaque. La limite de quantification de cette méthode est de 5 ng AF/g de milieu de culture.

- *Quantification de l'acide cyclopiazonique par chromatographie planaire*

La quantification de l'acide cyclopiazonique par chromatographie planaire a été réalisée comme précédemment décrit par El Mahgubi *et al.* (2013). Les extraits secs ont été dissous dans du méthanol. Ils ont ensuite été séparés par migration sur une plaque de silice (Merck) dans un bain constitué par un mélange acétate/isopropanol/ammoniac (20 :15 :10 v/v/v). Après séchage de la plaque,

l'acide cyclopiazonique a été révélé par pulvérisation d'une solution de paradiméthylaminobenzaldéhyde à 10% dans l'acétone (1:3, v/v) préparée de façon extemporanée. Les toxines ont ensuite été quantifiées par fluorodensitométrie à la longueur d'onde 600 nm en utilisant un fluorodensitomètre Shimadzu CS930 (Shimadzu corp., Kyoto, Japon). La quantification de l'acide cyclopiazonique a été réalisée par comparaison avec une gamme de standards déposés sur la même plaque. La limite de quantification de cette méthode est de 200 ng ACP/g de milieu de culture.

- *Confirmation des résultats par HPLC*

Les extraits secs ont été dissous dans un mélange eau-acétonitrile-méthanol (65 :17,5 :17,5, v/v/v) et ont été filtrés en utilisant une disque de porosité 0,45 µm (Thermo Fisher Scientific, Villebon Sur Yvette, Illkirch, France). L'analyse des aflatoxines a été réalisée en utilisant une chaîne UPLC Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific) et une colonne Luna C18 (125 x 2 mm, 5 µm, 100 Å) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) à 30°C. Les conditions utilisées pour la séparation des extraits ont été adaptées de Fu *et al.* (2008). Les toxines ont été séparées en utilisant un mélange isocratique d'un solvant A à 82,5% (eau acidifiée avec 0,2% d'acide acétique et acétonitrile (79 :21 v/v)) et d'un solvant B à 17,5% (méthanol pur). Le débit était réglé à 0,2 mL/min et 10 µl d'extrait ont été injectés. Les aflatoxines ont été détectées grâce au détecteur à fluorescence réglé à 365/430 nm pour l'excitation et l'émission. L'identité des pics détectés a ensuite été confirmée par analyse du spectre d'absorption en utilisant un détecteur à barrette de diode couplé au système. La quantification des aflatoxines a été réalisée grâce à un courbe étalon obtenu dans les mêmes conditions avec des standards de toxines pures.

A l'issue de ces analyses, en fonction de leur capacité à produire les différentes aflatoxines (B et G) et l'acide cyclopiazonique, les souches ont été classées en différents chemotypes comme proposé par Vaamonde *et al.* (2008). Le chemotype I correspond aux souches produisant de l'aflatoxine B et de l'ACP ; le chemotype II aux souches produisant des aflatoxines B et G et de l'ACP ; le chemotype III aux souches ne produisant que de l'Aflatoxine de type B, le chemotype IV aux souches ne produisant que de l'ACP et enfin, le chemotype V aux souches ne produisant aucune de ces toxines.

3- RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Biodiversité des *Aspergillus* section *Flavi* contaminant les épices commercialisés au Liban

Les épices sont des aliments à risque en ce qui concerne la contamination fongique et mycotoxique et plus particulièrement les aflatoxines. En effet, les lieux et les modalités de production de ces condiments peuvent être favorables au développement des espèces de la section *Flavi* et à la production de leurs toxines.

Bien que les épices soient très utilisées et très importantes dans la tradition culinaire libanaise, il n'existe aucune donnée concernant la contamination de ces ingrédients par les différentes espèces de la section *Flavi*.

L'objectif de ce premier travail a donc été de caractériser la biodiversité des espèces de la section *Flavi* pouvant être rencontrées dans des épices commercialisées au Liban.

Article

Morphologic, molecular and metabolic characterization of

***Aspergillus* section *Flavi* in spices marketed in Lebanon**

Makhlouf J., Carvajal-Campos A., Querin A., Tadrist S., Puel O., Lorber S., Oswald IP.,

Hamze M., Bailly JD., Bailly S.

Scientific Reports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN Morphologic, molecular and metabolic characterization of *Aspergillus* section *Flavi* in spices marketed in Lebanon

Joya Makhlouf^{1,2}, Amaranta ¹, Arlette Querin¹, Soraya Tadrist¹, Olivier ¹, Sophie ¹, Isabelle P. ¹, Monzer Hamze², Jean-Denis ¹ & Sylviane Bailly¹

Spices are used extensively in Lebanon not only to flavour foods but also for their medicinal properties. To date, no data are available regarding the nature of the toxigenic fungal species that may contaminate these products at the marketing stage in this country. Eighty samples corresponding to 14 different types of spices were collected throughout Lebanon to characterize the *Aspergillus* section *Flavi* contaminating spices marketed in Lebanon and the toxigenic potential of these fungal species. Most fungal genera and species were identified as belonging to *Aspergillus* section *Flavi*. *Aspergillus flavus* was the most frequent species, representing almost 80% of the isolates. Although identified as *A. flavus* by molecular analysis, some strains displayed atypical morphological features. Seven strains of *A. tamarii* and one *A. minisclerotigenes* were also isolated. Analyses of toxigenic potential demonstrated that almost 80% of strains were able to produce mycotoxins, 47% produced aflatoxins, and 72% produced cyclopiazonic acid, alone or in combination with aflatoxins.

In Lebanon, as in many Mediterranean countries, spices are used extensively not only to flavour foods but also for their medicinal properties. However, spices can be contaminated with various hazards^{1–3}, among which toxigenic fungi are probably the most important. Indeed, some fungal species produce toxic secondary metabolites named mycotoxins as they develop on human food and animal feed⁴. Among the hundreds of known mycotoxins, aflatoxins are the major ones for public health because they are the most potent of the known natural carcinogens, and the International Agency for Research on Cancer classified aflatoxin B1 (AFB1) in the group of molecules that are carcinogenic for both humans and animals (group 1)⁵. Chronic exposure to AFB1 is a major cause of hepatocarcinoma⁶ and this food contaminant has been associated with the highest number of DALYs (deaths and disability adjusted life years)⁷. Aflatoxins may contaminate many foods including cereals, dry fruits, and groundnuts. They are also frequent contaminants of spices. Indeed, spices are mainly produced in areas where both temperature and humidity favour fungal development and subsequent toxinogenesis. Methods of post-harvest processing (sun drying, handling, storage) can also allow secondary contamination and the development of moulds⁸. Previous studies have demonstrated that spices can be contaminated by mycotoxins and thus represent a direct source of exposure for consumers^{9–11}, as recapitulated in a recent review¹². That is why spices are specifically concerned by regulations on aflatoxins. For instance, the E.U. regulation restricts contamination to 10 µg/kg for total aflatoxins and 5 µg/kg for AFB1¹³. However, contamination of spices may exceed regulations and justify the withdrawal of contaminated products. As an illustration, in 2016, the European Rapid Alert System for Food and Feed recorded 79 notifications of mycotoxin contamination of spices and herbs, most of which corresponded to the presence of aflatoxin B1 at levels exceeding European limits^{12,14}.

Aflatoxins are produced by different fungal species that belong to the genus *Aspergillus* and more specifically to the *Flavi* section. For years, three main aflatoxigenic species were commonly considered in the section *Flavi*: *A. flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius*¹⁵. In the last decade, the use of molecular tools enabled the identification of new species belonging to the section *Flavi*, comprising 34 different species, of which 17 are aflatoxigenic^{16–22}.

¹Toxalim (Research Center in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, 180 Chemin de Tournefeuille, F-31027, Toulouse, France. ²Health and Environment Microbiology Laboratory, Lebanese University, Beirut, Lebanon. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.-D.B. (email: jd.bailly@envt.fr)

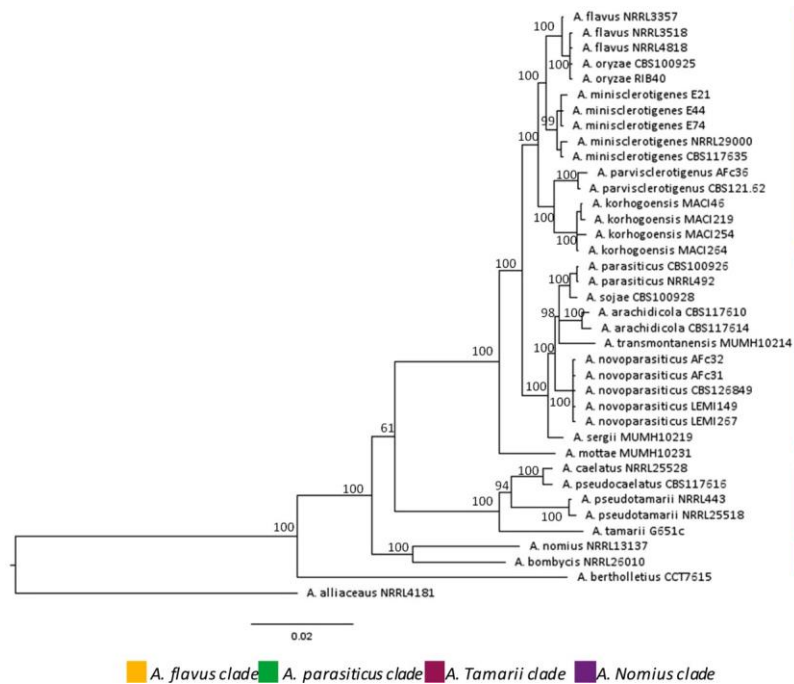


Figure 1. Phylogenetic tree of *Aspergillus* section *Flavi*. The phylogenetic tree is based on concatenated sequences from 4 genomic loci (*benA*, *cmdA*, *PreB* and *rpb1*). Bayesian tree was calculated from 38 strains and includes the type strains for most species. Strong bootstraps are shown at branch nodes. The sequences of primers and protocols used to generate gene fragments are available in Carvajal-Campos *et al.*¹⁹. *Petromyces alliaceus* NRRL 4181 was used as an outgroup taxon. (Adapted from Carvajal-Campos⁵¹).

Country	Type of spices	Number of samples	Method used for fungal identification	Incidence of <i>Aspergillus flavus</i> (%)	Toxicogenic potential (nature of toxin tested)	Incidence of toxicogenic strains	Reference
Brazil	Rosemary, cinnamon, clove, fennel, pepper, pepperoni, oregano	200	Morphology	15	Aflatoxins ^a	38%	26
India	Red chili, black pepper, turmeric, coriander, cumin, fennel, caraway, fenugreek, ginger	311	Morphology	19.3	Aflatoxins	20–56% ^b	27
Morocco	Paprika, cumin, black pepper, white pepper	80	Morphology and gene sequence	78	Aflatoxin B1, B2, G1, G2 and CPA	57%	9
Saudi Arabia	Cinnamon, cumin, sumac, ginger, saffron, fenugreek, pepper, fennel, thyme, cardamom, caraway, aniseed, clove	138	Morphology	17.4	ND	ND	28

Table 1. Fungal contamination of spices and toxicogenic potential of isolates. ^ano distinction between B and G aflatoxins. ^bIncidence of toxicogenic strains vary according to spice samples. ND: not determined.

These species can be distinguished by subtle morphological specificities, molecular changes in some gene sequences²² (Fig. 1) and, most importantly, through their ability to produce different mycotoxins^{16,23}. Indeed, some species, including *A. flavus*, *A. pseudotamarii* and *A. togoensis*, produce aflatoxins of B type, whereas others, including *A. parasiticus*, *A. minisclerotigenes*, *A. mottae*, *A. nomius*, *A. novoparasiticus*, *A. arachidicola* and *A. korhogoensis* produce both B and G type aflatoxins^{16,23}. Some species may also produce other toxic secondary metabolites such as cyclopiazonic acid (CPA)²⁴.

To date, only few studies aimed to characterized the nature of fungi and more precisely of *Aspergillus* section *Flavi* that may contaminate spices (Table 1). In most cases, fungal identification was done using a morphologic approach which may not have allowed the discrimination of recently identified species among the *Flavi* section. On the same way, the ability to produce aflatoxins was usually done with no distinction whether they belong to B or G type. With one exception⁹, the production of cyclopiazonic acid was not tested. No data are available regarding the nature of the fungal species that may contaminate spices at the marketing stage in Lebanon despite such knowledge is extremely important for risk assessment.

Within this context, the aim of this study was to finely characterize the *Aspergillus* section *Flavi* that can contaminate spices marketed in Lebanon and to determine the toxicogenic potential of the isolated strains.

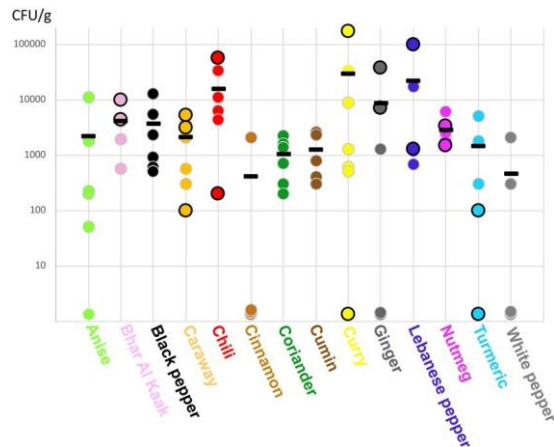


Figure 2. Total fungal load of spices samples (CFU/g). Fungal CFU were counted after 3 and confirmed after 5 days of culture on both MEA and salted MEA at 25 °C. Dots represent total fungal load of each sample whereas short bold lines represent the mean fungal load of each kind of spice. Dots circled in black correspond to packaged samples.

Results

Fungal counts and identification. The total fungal counts of the spice samples are presented in Fig. 2. The overall mean fungal contamination was 7.6×10^3 CFU/g, with marked variations among the samples. Most spices displayed a moderate mean fungal load that ranged from 10^3 to 4×10^3 CFU/g. These loads were associated with spices harvested as seeds or dried grains. Some samples were even less contaminated. For instance, three out of five white pepper samples displayed no detectable fungal contamination. Four out of five cinnamon samples were found to be uncontaminated. Some ginger and turmeric samples were also found to be uncontaminated, but in smaller percentages (2/5 and 1/5 respectively).

Other spices were heavily contaminated with fungi. This was the case for spices resulting from a mixture of several ingredients such as Baar El Kaak, curry and Lebanese pepper. Heavy contamination was also the case for chili samples, which displayed a mean level of contamination of 2×10^4 CFU/g.

Packaging did not limit fungal contamination of the spices. Indeed, for six out of the eight spices for which conditioned samples were analysed (caraway, chili, curry, Lebanese pepper, ginger, and Bhar Al Kaak), the most contaminated samples were the conditioned ones.

Identification of the fungal genera present in spices showed that *Aspergillus* was the most frequent genus, with *Aspergillus* isolates observed in 76% of samples (Table 2). *Aspergillus* was followed, in decreasing order, by Mucorales (36%), *Penicillium* (30%) and *Fusarium* (7.5%). The phytopathogenic genus *Fusarium* was only found in spices prepared from rhizomes (turmeric and ginger) or fruits (chili). Other fungal genera such as *Cladosporium*, *Alternaria*, *Acremonium*, and *Verticillium*, which mostly are derived from field flora, as well as *Paecilomyces*, *Spicaria* and *Hemispora*, were also present at lower levels. The complete analysis of fungal contamination of each sample is reported in Supplementary Table 1 (Table S1).

Aspergillus isolates belonged to 11 sections (Fig. 3), among which three predominated. Indeed, *Aspergillus* section *Flavi* isolates were found in almost 60% of the samples. They were present in all kinds of spices with the exception of cinnamon. Isolates of the *Nigri* section were also very common and were found in almost 50% of the analysed samples but not in the cinnamon or ginger. The section *Flavi* was observed in 40% of the samples. The distribution of these isolates was similar to that observed for those from the *Nigri* section. Isolates belonging to five other sections (*Fumigati*, *Terrei*, *Versicolores*, *Candidi* and *Nidulantes*) were also identified in 10 to 12% of the samples. Isolates belonging to the *Restricti* section were found in one sample of curry and one sample of nutmeg. In the same line, three isolates belonging to section *Circumdanti* (2) and *Wentii* (1) were found in Lebanese pepper (2/3) and Bhar Al Kaak samples (1/3), respectively. Ten out of 11 sections were observed in Lebanese pepper.

Characterization of *Aspergillus* section *Flavi*. Strains of *Aspergillus* section *Flavi* were heterogeneously distributed in 40% of the samples. They were present in all Bhar Al Kaak (5/5) samples and in most chili (5/7) and curry (4/7) samples. By contrast, they were only isolated in one sample of caraway, cumin, white pepper, and anise and in two samples of curcuma and coriander. No isolates of *Aspergillus* section *Flavi* were found in either cinnamon or ginger samples. A total of 53 strains were isolated, with some samples displaying several morphologically distinct isolates that were purified and further identified. For instance, 12 strains were obtained from five out of the seven samples of chili analysed.

Identification of *Aspergillus* species. Both morphological and molecular identification were performed to identify isolates at the species level. To this end, strains were cultivated on Malt Extract Agar (MEA), Creatinin sucrose Agar (CREA) and *Aspergillus flavus* and *parasiticus* Agar (AFPA) media, and their macroscopic and microscopic features were analysed. In parallel, ITS, *benA* and *cmdA* genes were sequenced. Complete results are given in Supplementary Table 2 (Table S2).

Fungal genus Spice	<i>Aspergillus</i>	Mucorales	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>	Other
Anise	4/6	2/6	2/6	1/6	3/6
Bhar al Kaak	5/5	4/5	4/5	0/5	1/5
Black pepper	6/6	2/6	3/6	0/6	4/6
Caraway	7/7	5/7	2/7	0/7	5/7
Chili	5/7	2/7	1/7	2/7	1/7
Cinnamon	0/5	0/5	1/5	0/5	1/5
Coriander	6/6	2/6	1/6	0/6	2/6
Cumin	4/5	2/5	2/5	1/5	4/5
Curry	6/7	5/7	0/7	0/7	2/7
Ginger	3/5	0/5	0/5	1/5	2/5
Lebanese pepper	5/5	3/5	4/5	0/5	2/5
Nutmeg	6/6	1/6	1/6	0/6	3/6
Turmeric	2/5	2/5	1/5	1/5	1/5
White pepper	2/5	2/5	0/5	0/5	0/5
Total	61/80	29/80	24/80	6/80	31/80

Table 2. Fungal genera present in spice samples. Results are expressed as the number of contaminated samples.

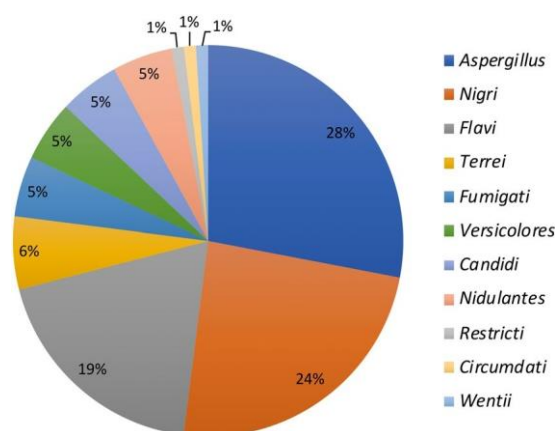


Figure 3. Relative proportion of *Aspergillus* sections in spice samples. Isolates belonging to *Aspergillus* genus were identified at the section level by both macroscopic and microscopic examination after five and seven days of culture at 25 °C on MEA, according to Pitt and Hocking⁴⁵ and Samson *et al.*⁴⁶. The relative proportion of each section was then calculated based on the total number of isolates from the 80 samples analysed.

Forty-five out of the 53 isolates (85%) were identified as *A. flavus* isolates by molecular analysis. Among them, 42 displayed typical *A. flavus* morphological features, with a yellowish green colony, colourless or yellowish on the reverse side and long conidiophores that are rough in the distal part, with mostly radiate and biseriate heads and with some columns in aerial mycelium. Conidia are oblong and mildly rough. Some variations occurred in the depth and colour of the colony and sclerotia formation (Table S2). For instance, the J33a, J34a, J42a and J62a isolates displayed dark olive-green colonies with numerous uniseriate columnar *Aspergillus* heads. The J117a and J86a isolates produced large dispersed sclerotia, whose diameter exceeded 500 nm, whereas only the J7 isolate produced numerous small sclerotia (approximately 500 nm in diameter). All typical *A. flavus* isolates produced aspergillic acid, as evidenced by the presence of a bright orange reverse on the AFPA medium. The production of organic acid that resulted in yellow discoloration of the CREA medium varied with the isolate (Table S2).

Three isolates displayed unusual morphological features but were nevertheless identified as *A. flavus* by molecular analysis; these findings are summarized in Fig. 4.

Seven strains (J4a, J6a, J31a, J37, J63c, J116b, and J118a) were identified as *A. tamarii* by morphological and molecular analyses. These strains were isolated from different spices including chili (2 isolates), black pepper (1), white pepper (1), Lebanese pepper (1), curry (1) and Bhar al Kaak (1). They displayed highly sporulated dark green-bronze colonies. The conidiophores were long, wide and finely rough. The vesicles were oblong, bearing divergent chains of big, round echinulate spores. All *A. tamarii* strains displayed a dark-brown reverse side on the AFPA medium.

One isolate (J117c) was identified as *A. minisclerotigenes*. This strain was obtained from a sample of Bhar al Kaak. It produced numerous small sclerotia with diameters <400 nm.








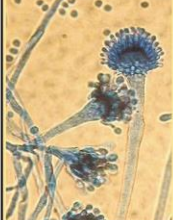
Isolate	Macroscopic features		Microscopic features	
NRRL62477	Yellow-green colony, Radiate heads on basal mycelium and some columns in aerial mycelium		Long conidiophores, rough in distal part. Mostly biseriate heads with some uniseriate ones. Globose smooth conidia	
J4c	Deep, woolly, brown-green olive colony Highly fasciculated white margin Abundant aerial mycelium Orange reverse AFPA weak; CREA-		Long and large conidiophores, rough mostly on distal part Thick cell walls Oblong uni- and biseriate vesicles, almost radiate Long chains of conidia	
J75e	Caramel – mustard colony (no visible green color) AFPA+, CREA-		Rough and warty conidiophores Uni- and biseriate radiate aspergillus heads Small yellow subglobose smooth or rough conidia	
J123a	Pale dull yellow-green colony All <i>Aspergillus</i> heads are columnar, both on basal and aerial mycelium AFPA+++; CREA++		Rough conidiophores with only uniseriate heads Elongated vesicle with sterigmate located on the top, bearing columns of big smooth conidia	

Figure 4. Main macro- and microscopic features of atypical *A. flavus* isolates compared to the referenced *A. flavus* NRRL62477 after 7 days of culture on MEA at 25 °C. Some isolates of the *Aspergillus* section *Flavi* displayed unusual morphologic features but were nevertheless identified as *Aspergillus flavus* by molecular identification (sequence of β -tubulin and calmodulin genes) (Table 6). Compared to a reference strain (NRRL 62477, previously isolated from paprika⁹) displaying typical *Aspergillus flavus* features, those atypical strains mainly differ by colour and aspect of conidial heads. The presence of such isolates demonstrates the strong phenotypical diversity that may exist within *Aspergillus flavus* species.

Toxigenic potential of *Aspergillus* section *Flavi* strains. Since the section *Flavi* contains species with differing abilities to produce mycotoxins, we further characterized the ability of the strains to produce different toxins. All *Flavi* section strains were analysed for the production of both aflatoxins of B and G type as well as CPA. Details on the levels of production of the different compounds are listed in Table S2.

Nearly half of the isolates (25/53) produced AFB1. Many isolates produced CPA alone (19/53) or simultaneously with aflatoxin (19/53). A total of 83% of the isolates were able to produce at least one toxin (Table 3).

Eighty percent of *A. flavus* strains were able to produce mycotoxins, of which 40% (18/45) produced both AFB and CPA (Chemotype I), whereas 27% (12/45) produced only CPA (Chemotype IV), and 13% (6/45) produced only AFB (Chemotype III). As expected, none of the *A. flavus* strains produced AFG (Chemotype II). All *A. tamarii* strains produced only CPA, and the *A. minisclerotigenes* strain produced both B and G aflatoxins, as well as CPA.

When the toxigenic potential of strains is considered as a function of the nature of the spice from which they were isolated, approximately 60% of the strains isolated from chili, Bhar al Kaak and curcuma produced AFB1. By contrast, none of the few isolates from anise, white pepper, caraway, cumin, and coriander were aflatoxigenic.

Some strains displayed a high toxigenic potential, producing more than 200 μg aflatoxins/Petri dish after 7 days at 25 °C. To better evaluate the risk associated with the presence of such strains in spices, the ratio of AF/CFU was calculated. As shown in Table 4, if a strain with high toxigenic potential contaminated a spice sample, 2 to 6×10^4 CFU/g could be sufficient to reach the E.U. regulation of 10 ng aflatoxins/g. Fortunately, in most cases, the fungal contamination levels observed for these strains in analysed samples were much lower, ranging from a few tens to a few hundred CFU/g. However, for one sample, a contamination level of 10^5 CFU *Aspergillus flavus*/g

Chemotype Spice	Number of isolates	Chemotype I (AFB+/CPA+)	Chemotype II (AFB+/AFG+/CPA+)	Chemotype III (AFB+)	Chemotype IV (CPA+)	Chemotype V (no toxin)
Anise	2	—	—	—	2/2	—
Bhar al Kaak	8	4/8	1/8	—	3/8	—
Black pepper	7	2/7	—	1/7	2/7	2/7
Caraway	1	—	—	—	—	1/1
Chili	12	5/12	—	2/12	4/12	1/12
Cinnamon	0	—	—	—	—	—
Coriander	3	—	—	—	3/3	—
Cumin	1	—	—	—	—	1/1
Curry	6	3/6	—	—	1/6	2/6
Ginger	0	—	—	—	—	—
Lebanese pepper	3	1/3	—	—	2/3	—
Nutmeg	3	1/3	—	1/3	—	1/3
Turmeric	6	2/6	—	2/6	1/6	1/6
White pepper	1	—	—	—	1/1	—
Total (%)	53	18/53 (34%)	1/53 (2%)	6/53 (11%)	19/53 (36%)	9/53 (17%)

Table 3. Chemotypes of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from spices.

Strain	Aflatoxin production (µg/Petri dish) ^a	CPA production (µg/Petri dish) ^a	CFU (Petri dish ± SD) ^a	AF/CFU ratio (×10 ⁷)	Theoretical number of CFU to reach 10 ng µg AF ^b (×10 ⁴)	Number of CFU/g observed in samples
J4b	213	376	1.13 × 10 ⁹ ± 9.4 × 10 ⁷	1.83	5.46	50
J6b	318	199	1.2 × 10 ⁹ ± 2 × 10 ⁸	2.65	3.77	100,000
J71a	251	333	1.49 × 10 ⁹ ± 2.2 × 10 ⁸	1.69	5.91	1,000
J75c	351	127	1.16 × 10 ⁹ ± 4 × 10 ⁷	3.03	3.30	200
J86a	578	127	1.2 × 10 ⁹ ± 2 × 10 ⁸	4.28	2.07	2,000
J117b	336	4532	1.48 × 10 ⁹ ± 1.4 × 10 ⁸	2.27	4.41	150

Table 4. Estimation of the risk associated with the presence of highly aflatoxigenic strains in spices. ^aafter 7 days at 25 °C. ^bE.U. regulation on AF content in spice is set at 10 ng/g.

was measured, demonstrating the possibility for reaching and exceeding the threshold, especially in cases of non-optimal storage.

Discussion

The aim of this study was to investigate the presence of *Aspergillus* section *Flavi* in spices marketed in Lebanon. To this end, 80 samples of commonly used spices were collected in markets, and the fungal contamination was analysed. The average fungal load of samples agreed with that found in other recent surveys conducted in other countries^{25,26}. Some differences were observed between spices, which could be due to either the composition of the condiments or to the preparation process. For instance, some spices, such as cinnamon or anise, are rich in phenolic compounds that may have antifungal properties, which may explain their lower fungal contamination^{27,28}. Similarly, the terpenes in ginger and turmeric and an unidentified protein in ginger were shown to have antifungal activity, which may help explain the low level of fungal contamination of these spices²⁹.

In the case of other spices, the preparation process may also help reduce the initial fungal load by removing the external parts of the berries/roots before marketing. For instance, white pepper, which is obtained by removing the pericarp from the berries, was less contaminated than black pepper. In the same way, spices obtained from roots that are peeled during their preparation (i.e., ginger and turmeric) were less contaminated than spices obtained from whole dried seeds or fruits. Spices prepared by mixing different plants/seeds were usually more contaminated than others, as observed for Bhar Al Kaak (a mixture of black pepper, fennel, cardamom and clove), curry (mixture of ginger, garlic, onion, coriander, cinnamon) and Lebanese pepper (mixture of black pepper, chili, coriander and cinnamon). Each ingredient used in these preparations represents a separate source of contamination; moreover, the mixture of these ingredients may be an additional source of contamination. Since each ingredient may also display variable water activity, the water activity of the final mixture is unstable, and finding the appropriate storage procedure is complex. As a demonstration, these complex samples were the ones most frequently contaminated with mucorales, which are hygroscopic fungi.

In this study, we also analysed the fungal load of samples that were packed in hermetically sealed plastic bags for sale. Surprisingly, this did not prevent fungal contamination; instead, for six out of the eight types of conditioned spices that we analysed, the most highly contaminated samples were the conditioned ones. Therefore, it appears that the traditional spice storage procedure, using open plastic containers that allow ventilation and limiting water migration and condensation, should be preferred to hermetically sealed packaging, which should

Gene	Gene name	Length bp	Primers		Sequence (Nucleotides: 5'→3')
			Forward	Reverse	
ITS (1–2)	18S ribosomal RNA gene partial sequence Internal Transcribed Spacer	565–613	ITS1		5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG
				ITS 2	5'-TTGGTCCGTGTTTCAAGACG
300–330		ITS5		5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	
			ITS 4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC	
benA -	β-tubulin	1125	β-tub 2a		5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC
				β-tub 2b	5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC
cmdA	Calmodulin	543	Cmd5		5'-CCGAGTACAAGGAGGCCCTTC-3'
				Cmd6	5'-CCGATAGAGGTCATAACGTGG-3'

Table 5. Sequence of the primers used for molecular identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates.

be reserved for completely dried or sterilized spices. The development of breathable materials, allowing air to pass and avoiding condensation but also protecting against external contaminations, would probably be of interest to improve the preservation of spices.

Aspergillus was the main genus found in the samples, and although a great variety of sections were present, sections *Nigri* and *Flavi* were very frequent, which is also in agreement with data reported in Morocco, India or Brasil^{9,30–32}. *Aspergillus* section *Aspergillus*, formerly named *Eurotium*³³, which corresponds to xerophilic isolates, was also frequently observed, as expected in dry commodities.

Fifty-three distinct strains of *Aspergillus* section *Flavi* were isolated from samples, among which 85% were identified as *A. flavus* by molecular analysis, demonstrating relatively low biodiversity within the section *Flavi*. Although the molecular identification agreed with the results of morphological examination of the isolates in most cases, a few isolates displayed atypical morphological features even though they were identified as *A. flavus* strains by molecular analysis. In the last decade, the use of molecular tools and gene sequencing has shown that the *Flavi* section is much more complicated than previously thought, and many new species have been introduced, increasing the number to 34^{21,22}. From our results, it appears that, beyond this genetic diversity, isolates identified as *A. flavus* may also present some morphological particularities, demonstrating the wide phenotypic variation within the species. Two of the three strains with unusual morphology were able to produce mycotoxins (AFB and CPA), demonstrating the importance of these isolates that could easily have been misidentified due to their atypical colouration. Since these particular isolates originated from different spices, this phenotypic variety does not appear to be correlated with substrate specificity but could rely on the presence of mutations on genes involved in pigment synthesis or on a distinct basal expression of these genes^{34,35}.

Seven out of 53 isolates (13%) were identified as *A. tamarii*. This proportion agrees with the results of previous studies reporting the presence of *A. tamarii* in spices, dry fruits and cereals^{25,30,36–38}. As expected, all these isolates produced CPA²⁴.

Finally, only one isolate was identified as *A. minisclerotigenes*. This species was first described in 2008²³. It has been reported in several geographic areas and on different substrates such as groundnuts in Argentina²³, groundnuts in Algeria³⁹, maize and almonds in Portugal¹⁷ and in spices marketed in Morocco⁹. *Aspergillus minisclerotigenes* is of interest due to its ability to produce both B and G aflatoxins together with CPA. However, this species is also quite difficult to isolate due to weak sporulation when cultured on MEA.

Our results show that more than 80% of the isolates belonging to the section *Flavi* are toxigenic. If we consider aflatoxin production, 47% of the strains produced AFB1 (chemotypes I and III). This proportion of aflatoxigenic strains agrees with data available on the toxigenic potential of *Aspergillus* section *Flavi* in different foodstuffs such as spices, chestnuts and cereals^{9,31,38,40}. Some strains were able to produce great amounts of aflatoxins when cultured *in vitro*. The presence of such highly toxigenic strains raise the question of the sanitary impact of the contamination. From data obtained while characterizing toxigenic potential, we demonstrated that the presence of only a few thousands CFU of these strains could be sufficient to reach the regulatory limit on the aflatoxin content in spices. Even if most samples of our study displayed relatively low levels of contamination, such fungal counts can be obtained, as observed in one sample of this study. This underscores the need for proper storage procedures, especially for spices that result from a mixture of different ingredients. The use of conditioning materials that protect from contamination but that also enable ventilation could improve the preservation of spices and limit the risk of fungal development and subsequent contamination with aflatoxins.

Notably, a high proportion of the strains were able to produce CPA, alone or in combination with aflatoxins. Although this mycotoxin has already been reported as a possible contaminant of several foods and feeds⁴¹, recent data are lacking on the contamination of foods and feeds with that CPA-producing species. Notably, the production of CPA by the *A. flavus* strains used as biocontrol agents appeared to be a strong limitation, which needs to be evaluated since CPA has been demonstrated to be cytotoxic and immunotoxic to human cells^{42,43}. Moreover, due to its frequent coproduction with aflatoxins, an investigation of the possible interaction between the two toxic compounds when ingested simultaneously would be interesting. Considering the origin of toxigenic strains, we observed that some spices are more often contaminated with toxigenic isolates than others. For example, 58, 62 and 67% of the strains from chili, Bhar al Kaak and turmeric, respectively, are toxigenic. By contrast, none of the few strains of anise, black pepper, caraway, coriander and cumin were shown to be toxigenic. This finding is also of interest regarding the risk assessment of contamination of these spices with mycotoxins.

Strain	Species	Beta-tubulin	Calmodulin
J4a	<i>Aspergillus tamarii</i>	MG957155	MG957162
J6a	<i>Aspergillus tamarii</i>	MG957156	MG957163
J31a	<i>Aspergillus tamarii</i>	MG957157	MG957164
J37	<i>Aspergillus tamarii</i>	MG957158	MG957165
J63c	<i>Aspergillus tamarii</i>	MG957159	MG957166
J116b	<i>Aspergillus tamarii</i>	MG957160	MG957167
J118a	<i>Aspergillus tamarii</i>	MG957161	MG957168
J117c	<i>Aspergillus minisclerotigenes</i>	MG957169	MG957170
J4c	<i>Aspergillus flavus</i>	MG957171	MG957174
J75e	<i>Aspergillus flavus</i>	MG957172	MG957175
J123a	<i>Aspergillus flavus</i>	MG957173	MG957176

Table 6. Nucleotide accession numbers for *benA* and *cmdA* of *A. flavus* strains with atypical morphology, *A. tamarii* and *A. minisclerotigenes* strains isolated from Lebanese spices.

In conclusion, this study reports, for the first time, the diversity of *Aspergillus* section *Flavi* in spices marketed in Lebanon. The results reveal that *A. flavus* is the most frequent species in the samples analysed and that the proportion of toxigenic strains is high. This study also demonstrated that some spices are frequently contaminated with toxigenic strains and should probably be submitted to specific safety controls.

Methods

Solvents and reagents. All solvents were of HPLC grade and purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). Medium and agar were purchased from BIOKAR Diagnostics (Allonne, France), and Tween 80, from Merck (Darmstadt, Germany). Mycotoxin standards were purchased from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France). Aflatoxins were dissolved in toluene-acetonitrile (98:2, v/v) and cyclopiazonic acid in methanol to obtain 200 µg/ml stock solutions that were stored at -20 °C. Standard solutions used for HPLC analysis were stored at 4 °C and changed monthly. Taq DNA polymerase used for molecular identification was purchased from Invitrogen (Carlsbad, Ca, USA).

Samples. Eighty samples were randomly collected from several retailers across all Lebanese regions. Fourteen different types of spices were analysed: anise (n = 6), Bhar Al Kaak (n = 5), caraway (n = 7), chili (n = 7), cinnamon (n = 5), coriander (n = 6), cumin (n = 5), curry (n = 7), ginger (n = 5), nutmeg (n = 6), black pepper (n = 6), white pepper (n = 5), Lebanese pepper (n = 5), turmeric (n = 5). All samples were of commercial grade, and to be representative of what can enter human food chain, no macroscopically mouldy sample was taken.

Sixty-three out of the 80 spices samples were taken from batches stored in plastic containers with no particular protection. Some samples were hermetically sealed in plastic bags before marketing (17 samples including Bhar Al Kaak (n = 2), caraway (n = 3), chili (n = 2), curry (n = 2), ginger (n = 2), nutmeg (n = 2), Lebanese pepper (n = 2) and turmeric (n = 2).

Approximately 100 g of each sample were collected and carefully placed in 200 ml sterile plastic jars (Thermo-Fischer, Dardilly, France). To avoid any fungal development without altering spore viability, samples were stored at 4 °C until analysis^{9,44}. In the laboratory, samples in the form of grains were finely ground in a Waring blender (Waring Laboratory, Torrington, CT, USA).

Fungal count and identification. Twenty grams of each sample were mixed with 180 ml of 0.05% Tween 80 for 2 min in a Waring blender and then placed on a horizontal shaking table at 220 rpm for one hour. Decimal dilutions were prepared in 0.05% Tween 80, and 100 µl of each dilution were plated on both MEA medium and Salted MEA (MEA + 6% NaCl)⁹. This last medium was used to identify xerophilic species and to limit Mucorale development that may prevent a correct enumeration and identification of species with a low growth rate. Fungal colonies were counted after three days of culture at 25 °C and confirmed after five days. The limit of detection for the fungal count was 10 CFU/g of sample. The colonies were then identified according to Pitt and Hocking⁴⁵ and Samson *et al.*⁴⁶. *Aspergillus* section *Flavi* strains were isolated from plates by several platings on MEA and Salted MEA.

Characterization of *Aspergillus* section *Flavi* strains. *Morphological identification.* *Aspergillus* section *Flavi* strains were identified at the species level by both macroscopic and microscopic examination after five and seven days of culture at 25 °C on MEA, CREA (3.0 g creatine, 30 g sucrose, 0.5 g KCl, 0.5 g MgSO₄·7H₂O, 0.5 g FeSO₄·7H₂O, 1.3 g K₂HPO₄·3H₂O, 0.05 g Bromocresol purple, 15.0 g agar, distilled water to bring to 1 litre) and AFPA (Thermo-Fisher Diagnostics, Dardilly, France) media according to Pitt *et al.*⁴⁷ and Varga *et al.*¹⁶.

Molecular identification. The molecular identification of all *Aspergillus* section *Flavi* strains was first performed by internal transcribed spacer (ITS) rRNA sequencing. For strains displaying atypical morphological features, this was completed by beta-tubulin (*benA*) and calmodulin (*cmdA*) gene amplification and sequencing. The strains were cultured in yeast extract sucrose (YES) broth and placed on a shaking incubator at 160 rpm at 27 °C for three days. Genomic DNA was isolated from mycelia, as previously described⁴⁸. Primers used for the

molecular identification are listed in Table 5. PCR reactions were carried out in a GeneAmp PCR 2700 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, USA). PCR products were purified with a GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich) and sequenced on an ABI3130XL sequencer (Applied Biosystems) using the dye terminator technology. PCR products were sequenced in both directions. Nucleotide sequence accession numbers for *benA* and *cmdA* from *A. flavus* with atypical morphology, *A. tamarii* and *A. minisclerotigenes* are listed in Table 6.

Mycotoxigenic potential of isolates. To assess the toxigenic potential of *Aspergillus* section *Flavi* strains, a spore suspension was prepared from a 7-day culture, and 100 spores were centrally inoculated on MEA and cultured for seven days at 25 °C. After this incubation period, three sporulating cultures were analysed for toxin production. In parallel, at the end of the incubation period, three other cultures were used to perform a CFU count as previously described (see paragraph 4.3).

Toxins were then extracted from the whole culture medium by mechanical agitation in appropriate solvents. Extracts were filtered, and toxins were, as a first screening step, separated by thin layer chromatography (TLC) and quantified by fluorodensitometry using a Shimadzu CS930 fluorodensitometer (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan), as previously described⁹. Results were further confirmed by HPLC analysis.

Evaporated extracts were diluted with 500 µL of water-acetonitrile-methanol (65:17.5:17.5, v/v/v) and filtered through a 0.45 µm disk (Thermo Scientific Fisher, Villebon-Sur-Yvette, France). Sample analysis was performed with a Dionex UltiMate 3000 UHPLC system (Thermo Scientific, Illkirch, France) using a liquid chromatography column Luna C18 (125 × 2 mm, 5 µm, 100 Å) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) at 30 °C. Separation conditions were adapted from Fu *et al.*⁴⁹, with slight modifications. Briefly, a 20 min isocratic mode program was delivered at 82.5% of eluent A: acidified water (0.2% of acetic acid) and acetonitrile (79:21, v/v) and 17.5% of eluent B: pure methanol. The flow rate was at 0.2 mL/min with a sample injection volume of 10 µL. Aflatoxins were detected using a fluorescent detector at 365/430 nm excitation/emission wavelengths. Peak identity was further confirmed by analysis of the absorption spectrum with a diode array detector (DAD) coupled to the system. Production levels of aflatoxins in media were calculated based on a standard calibration curve.

Based on their toxigenic potential (AFB +/-, AFG +/-, CPA +/-), isolates were classified into five chemotypes as proposed by Vaamonde *et al.*⁵⁰: Chemotype I for AFB and CPA producers; Chemotype II for AFB, AFG and CPA producers; Chemotype III for AFB-only producers; Chemotype IV for CPA-only producers; and Chemotype V for non-toxicogenic isolates.

References

- Di Bella, G. *et al.* Organic contamination of Italian and Tunisian culinary herbs and spices. *J. Environ. Sci. Health B*. **17**, 1–12, <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1571364> (2019).
- Man, A., Mare, A., Toma, F., Curticapean, A. & Santacrocce, L. Health threats from contamination of species commercialized in Romania: risks of fungal and bacterial infections. *Endoc. Metab. Immune Disord. Drug Targets* **16**, 197–204, <https://doi.org/10.2174/1871530316666160823145817> (2016).
- Hariram, U. & Labbé, R. Spore prevalence and toxigenicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates from U.S. retail spices. *J. Food Prot* **78**, 590–596, <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-380> (2015).
- Omotayo, O. P., Omotayo, A. O., Mwanza, M. & Babalola, O. O. Prevalence of mycotoxins and their consequences on Human health. *Toxicol. Res.* **35**, 1–7, <https://doi.org/10.5487/TR.2019.35.1.001> (2019).
- I.A.R.C. 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 (1993).
- Liu, Y. & Wu, F. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environ. Health Perspect.* **118**, 818–824, <https://doi.org/10.1289/ehp.0901388> (2010).
- Gibb, H. *et al.* World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of four foodborne chemical toxins, 2010: a data synthesis. *F1000Research* **4**, 1–14, <https://doi.org/10.12688/f1000research.7340.1> (2015).
- Mandee, Q. A. Fungal contamination of some imported spices. *Mycopathologia* **159**, 291–298, <https://doi.org/10.1007/s11046-004-5496-z> (2005).
- El Mahgubi, A. *et al.* Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in spices marketed in Morocco. *Food Contr.* **32**, 143–148, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.013> (2013).
- Valle Garcia, M., Mallman, C. A. & Venturini Copetti, M. Aflatoxigenic and ochratoxigenic fungi and their mycotoxins in spices marketed in Brazil. *Food Res. Int.*, **106**, 10.106/j.foodres.2017.12.06 136–140 (2018).
- Asghar, M. A., Zahir, E., Rantilal, S., Ahmed, A. & Iqbal, J. Aflatoxin in composite spices collected from local markets of Karachi, Pakistan. *Food Addit. Contam. Part B Surveillance* **9**, 113–9, <https://doi.org/10.1080/19393210.2016.1150356> (2016).
- Kabak, B. & Dobson, A. D. W. Mycotoxins in spices and herbs: an update. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **57**, 18–34, <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.772891> (2017).
- European Union Commission regulation 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Europ. Un.* **L364**, <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.772891> 5–24 (2006).
- European Commission. RAFF – Food and Feed Safety Alerts. https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en.
- Cary, J. W. & Ehrlich, K. C. Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications. *Mycopathologia* **162**, 167–177, <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0051-8> (2006).
- Varga, J., Frisvad, J. C. & Samson, R. A. Two new aflatoxin producing species and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Stud. Mycol.* **69**, 57–80, <https://doi.org/10.3114/sim.2011.69.05> (2011).
- Soares, C., Rodrigues, P., Peterson, S. W., Lima, N. & Venancio, A. Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. *Mycologia* **104**, 682–697, <https://doi.org/10.3852/11-088> (2012).
- Taniwaki, M. H. *et al.* *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil nuts. *PLoS One* **7**, e42480, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042480> (2012).
- Carvajal-Campos, A. *et al.* *Aspergillus korhogoensis*, a novel aflatoxin producing species from the Côte d'Ivoire. *Toxins* **9**, 353, <https://doi.org/10.3390/toxins9110353> (2017).
- Pitt, J. I. *et al.* *Aspergillus hancockii* sp. nov., a biosynthetically talented fungus endemic to southeastern Australian soils. *PLoS One* **12**, e0170254, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170254> (2017).
- Singh, P., Orbach, M. J. & Cotty, P. J. *Aspergillus texensis*: a novel aflatoxin producer with S morphology from the United States. *Toxins* **10**, <https://doi.org/10.3390/toxins10120513> (2018).
- Frisvad, J. C. *et al.* Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Stu. Mycol.* **93**, 1–63, <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.001> (2019).

23. Pildain, M. B. *et al.* Two novel Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 725–35, <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65123-0> (2008).
24. Uka, V. *et al.* Unravelling the diversity of the cyclopiazonic acid family of mycotoxins in *Aspergillus flavus* by UHPLC triple-TOF HRMS. *Toxins* **9**, <https://doi.org/10.3390/toxins9010035> (2017).
25. Hashem, M. & Alamri, S. Contamination of common spices in Saudi Arabia markets with potential mycotoxin-producing fungi. *Saudi J. Biol. Sci.* **17**, 167–175, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.02.011> (2010).
26. Feroz, F., Shimizu, H., Nishioka, T., Mori, M. & Sakagami, Y. Bacterial and fungal counts of dried and semi-dried foods collected from Dhaka, Bangladesh and their reduction methods. *Biocontrol Sci.* **21**, 243–251, <https://doi.org/10.4265/bio.21.243> (2016).
27. Ozcan, M. M. & Chalchat, J. C. Chemical composition and antifungal effect of anise (*Pimpinella anisum* L.) fruit oil at ripening stage. *Ann. Microbiol.* **56**, 353–358, <https://doi.org/10.1007/BF0317531> (2006).
28. Liu, Q., Meng, X., Zhao, C. N., Tang, G. Y. & Li, H. B. Antibacterial and antifungal activities of spices. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1283, <https://doi.org/10.3390/ijms18061283> (2017).
29. Zaccchino, S. A. *et al.* Plant phenolic and terpenoids as adjuvants of antibacterial and antifungal drugs. *Phytomedicine* **37**, 27–48, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.10.018> (2017).
30. Valle Garcia, M., Parussolo, G., Brombilla Moro, C., Olivier Bernardi, A. & Venturini Copetti, M. Fungi in spices and mycotoxinogenic potential of some *Aspergilli* isolated. *Food Microbiol.* **73**, 93–98, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.013> (2018).
31. Jeswal, P. & Kumar, D. Mycobiota and natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A, and citrinin in Indian spices confirmed by LC-MS/MS. *Int. J. Microbiol.* **2015**, <https://doi.org/10.1155/2015/242486> (2015).
32. Aiko, V. & Meht, A. Prevalence of toxigenic fungi in common medicinal herbs and spices in India. *3 biotech* **159**, <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0476-9> (2016).
33. Chen, A. J. *et al.* Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Aspergillus* (formerly *Eurotium*) and its occurrence in indoor environments and food. *Stud. Mycol.* **88**, <https://doi.org/10.1016/j.stmy.2017.07.001> 37–135 (2017).
34. Valiante, V. *et al.* The *Aspergillus fumigatus* conidial melanin production is regulated by the bifunctional bHLH DevR and MADS-box RlmA transcription factors. *Mol. Microbiol.* **102**, 321–335, <https://doi.org/10.1111/mmi.13462> (2016).
35. Sung, C. T. *et al.* Overexpression of a three-gene conidial pigment biosynthetic pathway in *Aspergillus nidulans* reveals the first known to acetylate tryptophan. *Fung. Genet. Biol.* **101**, 1–6, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.12.013> (2017).
36. Da Chagas, O., Freire, F., Kozakiewicz, Z. & Paterson, R. M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia* **149**, 13–19 (2000).
37. Perrone, G. *et al.* Population structure and aflatoxin production by *Aspergillus* section *Flavi* from maize in Nigeria and Ghana. *Food Microbiol.* **41**, 52–59, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.12.005> (2014).
38. Prencepe, S. *et al.* Characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from fresh chestnuts and along chestnuts flour process. *Food Microbiol.* **69**, 159–169, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.004> (2018).
39. Guezlane-Tebitel, N., Bouras, N., Mokrane, S., Benayad, T. & Mathieu, F. Aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from marketed peanuts (*Arachis hypogaea*) in Algiers (Algeria). *Ann. Microbiol.* **62**, 1–11, <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0473-0> (2012).
40. Riba, A. *et al.* *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 2772–2777, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.005> (2010).
41. Fernandez Pinto, V., Patriarca, A., Locani, O. & Vaamonde, G. Natural co-occurrence of aflatoxin and cyclopiazonic acid in peanuts grown in Argentina. *Food Addit. Contam.* **18**, 1017–1020, <https://doi.org/10.1080/02652030110057125> (2001).
42. King, E. D., Bassi, A. B., Ross, D. C. & Druebbisc, B. An industry perspective of the use of “atoxigenic” strains of *Aspergillus flavus* as biological control agent and the significance of cyclopiazonic acid. *Toxin Rev.* **30**, 33–41, <https://doi.org/10.3109/15569543.2011.588818> (2011).
43. Hymery, N., Masson, F., Barbier, G. & Coton, E. Cytotoxicity and immunotoxicity of cyclopiazonic acid on human cells. *Toxicol. in Vitro* **28**, 940–947, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.04.003> (2014).
44. Kong, W. *et al.* Occurrence of toxigenic fungi and determination of mycotoxins by HPLC-FLD in functional foods and spices in China markets. *Food Chem.* **146**, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.005> 3220–3226 (2014).
45. Pitt, J. I. & Hocking, A. D. *Fungi and Food spoilage*. Third Ed., Springer, New-York (2009).
46. Samson, R. A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C. & Andersen, B. Food and indoor fungi. CBS Knaw, Utrecht, The Netherlands (2010).
47. Pitt, J. I., Hocking, A. D. & Glenn, D. R. An improved medium for detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *J. Appl. Bacteriol.* **54**, 109–114, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb01307.x> (1983).
48. Adjovi, Y. *et al.* Contrast between natural occurrence of toxigenic *Aspergilli* of the *Flavi* section and Aflatoxin B1 in cassava: possible explanation. *Food Microbiol.* **38**, 151–159, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.08.005> (2014).
49. Fu, Z., Huang, X. & Min, S. Rapid determination of aflatoxins in corn and peanuts. *J. Chromatogr. A* **1209**, 271–274, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.054> (2008).
50. Vaamonde, G., Patriarca, A., Fernandez Pinto, V., Comerio, R. & Degrossi, C. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 79–84, [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00101-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00101-6) (2003).
51. Carvajal-Campos A. Characterization of *Aspergillus* section *Flavi*: molecular markers as tool to unmask cryptic species. Ph.D dissertation. Université de Toulouse, **209** p. <http://thesesups-ups-tlse.fr/3930/> (2018).

Acknowledgements

The authors thank Mrs. Daphnee Goodfellow for the English language editing and Mr Anwar El Mahgubi for technical assistance. This work was financed by the projects Aflared (joint project, 001–2012 STDF-AIRD) and ToxinFree (Campus France PHC cède 32763).

Author Contributions

Makhlouf J. collected the samples and performed the mycological analysis with technical support from Querin A. Carvajal-Campos A. performed molecular analysis with technical support from Tadriss S. Puel O. and Lorber S. designed the molecular analysis. Oswald I. and Hamze M. supervised the work. Bailly J.D. designed and supervised experiments. Bailly S. supervised the mycological analysis and performed morphological identification. All authors participated in the manuscript preparation.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41704-1>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher’s note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

MAKHOLOUF Joya, CARVAJAL-CAMPOS Amaranta, QUERINARlette, TADRIST Soraya, PUEL Olivier, LORBER Sophie, OSWALD Isabelle, HAMZE Monzer, BAILLY Jean-Denis, BAILLY Sylviane. Morphologic, molecular and metabolic characterization of Aspergillus section Flavi in spices marketed in Lebanon
Supplementary table 1: fungal analysis of spice samples from different regions of Lebanon

Spices	Geographic origin	State	Genus <i>Aspergillus</i>										Other fungal genera													total count (CFU/g)	Yeast (g)				
			A. section <i>aspergillus</i>	A. section <i>candidi</i>	A. section <i>circumdati</i>	A. section <i>flavi</i>	A. section <i>fumigati</i>	A. section <i>nidulantes</i>	A. section <i>nigri</i>	A. section <i>restricti</i>	A. section <i>terrei</i>	A. section <i>versicolors</i>	A. section <i>veritii</i>	<i>Aspidia</i>	<i>Acremonium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Hemisporea</i>	<i>Mucor</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Rhizomucor</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Spicaria</i>			<i>Synephalastrum</i>	<i>Verticillium</i>	<i>sterile mycelia</i>	
Anise 1	Akkar	Powder	3,0E+01																			1,0E+01							1,0E+01	5,0E+01	1,0E+02
Anise 2	Borj Hammoud	Grain																					2,0E+02							2,0E+02	4,0E+04
Anise 3	Tripoli	Powder	1,0E+02						3,0E+02							1,0E+02	5,0E+02			5,0E+02	2,0E+02							1,0E+02	1,8E+03	1,0E+03	
Anise 4	Bekaa	Powder				3,0E+02										2,0E+02						1,0E+04						5,0E+02	1,1E+04	5,0E+03	
Anise 5	Bekaa	Powder												2,0E+02															2,0E+02		
Anise 6	Beyrouth	Powder																													2,0E+02
Bhar Al Kaak 1	Akkar	Powder	1,0E+02			4,0E+01				2,0E+02			1,0E+01	1,0E+01								1,0E+02					1,0E+02	5,6E+02	2,0E+03		
Bhar Al Kaak 2	Beyrouth	Powder	3,0E+03		1,0E+02	5,5E+02		1,0E+01	1,0E+02				2,0E+01		1,0E+01							2,0E+02		3,0E+01		1,0E+01		4,0E+03	1,0E+03		
Bhar Al Kaak 3	Zahle	Powder*	4,0E+03			3,0E+01			1,0E+02													2,0E+02		1,0E+02				4,4E+03	3,0E+03		
Bhar Al Kaak 4	Baalbeck	Powder	1,0E+03			1,0E+01		2,0E+01	3,0E+02				4,0E+02		5,0E+01			5,0E+01			6,0E+01		1,0E+01				1,9E+03	3,0E+03			
Bhar Al Kaak 5	Batroun	Powder*	7,0E+03			2,0E+02			2,0E+03											6,0E+01			7,0E+02				1,0E+04	2,0E+03			
Black pepper 1	Beyrouth	Powder	5,0E+03			1,0E+01			5,0E+01			1,0E+02	3,0E+02									2,0E+01		5,0E+01	1,0E+01			5,5E+03			
Black pepper 2	Tripoli	Powder	2,0E+03			4,0E+03			1,0E+03													6,0E+03						1,3E+04	1,0E+03		
Black pepper 3	Bekaa	Powder	1,5E+03	1,0E+02			5,0E+02			2,0E+02																		2,3E+03	1,0E+02		
Black pepper 4	Borj Hammoud	Powder	1,0E+02	1,0E+02		1,0E+02		1,0E+02														2,0E+02						9,0E+02			
Black pepper 5	Bekaa	Powder	1,0E+02	1,0E+02		1,0E+02										1,0E+02											1,0E+02	6,0E+02	6,0E+03		
Black pepper 6	Jnoub	Powder	3,0E+02				1,0E+02		1,0E+02																			5,0E+02			
Caraway 1	Tripoli	Powder	4,0E+02				2,0E+01	1,0E+02														2,0E+01					2,0E+01	5,6E+02	1,0E+02		
Caraway 2	Borj Hammoud	Powder	1,0E+02					1,0E+02																		1,0E+02		3,0E+02	1,0E+02		
Caraway 3	Hemel	Powder	3,0E+02					1,0E+03		1,0E+03																		3,8E+03	2,0E+02		
Caraway 4	Beyrouth	Powder	2,0E+03	1,0E+02																								2,1E+03			
Caraway 5	Koura	Powder*				5,0E+03		1,0E+02								1,0E+02											5,3E+03	3,0E+03			
Caraway 6	Jbeil	Powder*	2,0E+03																		1,0E+02							3,1E+03	2,0E+03		
Caraway 7	Jnoub	Powder*						1,0E+02																			1,0E+02				
Chili 1	Bcharre	Powder	3,0E+03			1,1E+03		2,0E+03																3,0E+02				6,4E+03			
Chili 2	Zahle	Powder*																						2,0E+02				2,0E+02			
Chili 3	Tripoli	Powder				2,2E+03										2,0E+03							1,0E+02				4,3E+03	2,0E+03			
Chili 4	Hemel	Powder	2,0E+03			1,0E+03		5,0E+03		1,0E+03						1,0E+03						1,0E+03		1,0E+02			1,1E+04				
Chili 5	Beyrouth	Powder				3,0E+03			3,0E+04																			3,3E+04			
Chili 6	Baalbeck	Powder																								2,0E+02		2,0E+02			
Chili 7	Koura	Powder*				3,0E+03		4,0E+03	5,0E+04																			5,7E+04	6,0E+03		
Cinnamon 1	Tripoli	Powder																										0,0E+00			
Cinnamon 2	Beyrouth	Powder																										0,0E+00			
Cinnamon 3	Baalbeck	Powder																				1,0E+02				2,0E+03	2,1E+03	5,0E+02			
Cinnamon 4	Jbeil	Stick																										0,0E+00			
Cinnamon 5	Jnoub	Stick																										0,0E+00			
Coriander 1	Zgharta	Powder	2,0E+03															2,0E+02			1,0E+01						2,2E+03	2,0E+02			
Coriander 2	Borj Hammoud	Powder	5,0E+02					1,0E+02									1,0E+02										7,0E+02	5,0E+02			
Coriander 3	Zahle	Powder	9,0E+02			1,0E+02	4,0E+02									1,0E+02					1,0E+02						1,6E+03	1,0E+02			
Coriander 4	Hemel	Powder											3,0E+02														3,0E+02	3,0E+02			
Coriander 5	Tripoli	Powder	1,0E+02																							1,0E+02	2,0E+02				
Coriander 6	Beyrouth	Powder	1,0E+03			4,0E+02																					1,4E+03				
Cumin 1	Bekaa	Powder															4,0E+02										4,0E+02	3,0E+02			
Cumin 2	Bekaa	Powder	1,0E+02																	1,0E+02	1,0E+02						3,0E+02	3,0E+02			
Cumin 3	Tripoli	Powder				1,0E+02			2,0E+02						4,0E+02					1,0E+02							8,0E+02	5,0E+02			
Cumin 4	Borj Hammoud	Powder						1,0E+02			2,0E+02					1,0E+02					2,0E+03		2,0E+02				2,6E+03	1,0E+02			
Cumin 5	Beyrouth	Powder	5,0E+02				5,0E+02	3,0E+02																			2,3E+03	2,0E+02			
Curry 1	Zgharta	Powder*	3,0E+04			1,0E+05		1,0E+03	3,0E+04				1,0E+03										1,0E+03				1,6E+05	1,0E+03			
Curry 2	Tripoli	Powder	5,0E+03			6,0E+02			1,0E+03	2,0E+03	1,0E+02													1,0E+02			8,8E+03	1,0E+03			
Curry 3	Jbeil	Powder	5,0E+02																					1,0E+02			6,0E+02				
Curry 4	Bekaa	Powder	4,0E+02	3,0E+02		2,0E+02		2,0E+02								1,0E+02									1,0E+02		1,3E+03				
Curry 5	Borj Hammoud	Powder						1,0E+02															2,0E+02				5,0E+02				
Curry 6	Jnoub	Powder*																									0,0E+00	2,0E+02			
Curry 7	Beyrouth	Powder				4,0E+03			3,0E+04															1,0E+02			3,4E+04				
Ginger 1	Zahle	Powder																										0,0E+00			
Ginger 2	Hemel	Powder	2,0E+02										2,0E+02		7,0E+02							2,0E+02					1,3E+03	2,0E+02			
Ginger 3	Beyrouth	Powder																									0,0E+00				
Ginger 4	Koura	Powder*		6,0E+03																							3,7E+04				
Ginger 5	Jnoub	Powder*	7,0E+03																									7,0E+03			

Lebanese pepper 1 Zgharta	Powder	5,0E+03			8,0E+02	7,0E+03		1,0E+03												3,0E+03	5,0E+01							1,7E+0				
Lebanese pepper 2 Beyrouth	Powder	6,0E+02				2,0E+01								1,0E+01							5,0E+01								6,8E+0			
Lebanese pepper 3 Baalbeck	Powder	1,0E+03		1,0E+01				1,0E+02						2,0E+01						1,0E+02	1,0E+01	2,0E+01							1,3E+0	3,0E+01		
Lebanese pepper 4 Mont Liban	Powder*	1,0E+03						1,0E+02											1,0E+02										1,3E+0			
Lebanese pepper 5 Al Koura	Powder*	7,0E+04	1,0E+01		2,1E+02	2,0E+04	1,0E+02	5,0E+03		1,0E+01	1,0E+03	1,0E+02								1,0E+02									9,7E+0			
Nutmeg 1 Tripoli	Powder	3,0E+03												2,0E+01						1,0E+01									3,0E+0			
Nutmeg 2 Borj Hammoud	Powder	6,0E+02						1,0E+03	2,0E+02																					1,8E+0		
Nutmeg 3 Jnoub	Powder	1,0E+03			1,0E+03	2,0E+02		2,0E+02											1,0E+02											2,5E+0		
Nutmeg 4 Beyrouth	Nut	5,0E+03			1,0E+03																									6,0E+0		
Nutmeg 5 Baalbeck	Powder*					5,0E+02													1,0E+02		1,0E+02	6,0E+02				2,0E+02	1,5E+0	2,0E+03				
Nutmeg 6 Koura	Powder*	1,0E+03			1,0E+03			6,0E+02																			7,0E+02	3,3E+0	2,0E+03			
Turmeric 1 Tripoli	Powder																	3,0E+02												3,0E+0		
Turmeric 2 Beyrouth	Powder				1,0E+03			1,0E+03		2,0E+03											1,0E+03					1,0E+02	5,1E+0					
Turmeric 3 Mont Liban	Powder*																								1,0E+02				1,0E+0			
Turmeric 4 Zahle	Powder*																													0,0E+0		
Turmeric 5 Beyrouth	Powder	5,0E+02	3,0E+02		5,0E+02			2,0E+01				3,0E+02										1,0E+02								1,8E+0		
White pepper 1 Bekaa	Powder																													0,0E+0		
White pepper 2 Tripoli	Powder	4,0E+02			1,0E+03	5,0E+02		1,0E+02																		1,0E+02				2,1E+0	2,0E+02	
White pepper 3 Bekaa	Powder	2,0E+02																								1,0E+02				3,0E+0	2,0E+02	
White pepper 4 Borj Hammoud	Powder																													0,0E+0		
White pepper 5 Beyrouth	Powder																													0,0E+0		

*: samples that were conditioned before analysis

Supplementary Table 2

Identification, origin, initial count and toxigenic potential of the 53 strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from spices samples

Strain number	Species	Spice	Count in sample (CFU/g)	AFPA	Mycotoxin production profil (µg/PD)					Chemotypes	Sclerotia
					CPA	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2		
J58b	<i>Aspergillus flavus</i>	Anise	100	+++	< LOQ	ND	ND	ND	ND	IV	-
J58c	<i>Aspergillus flavus</i>		200	(+)	57.5	ND	ND	ND	ND	IV	-
J2	<i>Aspergillus flavus</i>	Bhar el Kaal	40	++	172.1	146.4	< LOQ	ND	ND	I	-
J117a	<i>Aspergillus flavus</i>	Bhar al Kaal	300	+++	49.8	ND	ND	ND	ND	IV	Some big sclerotia (>>500 µm)
J117b	<i>Aspergillus flavus</i>		150	++	4532.5	335.9	< LOQ	ND	ND	I	-
J117c	<i>Aspergillus minisclerotigenes</i>		100	++	1216.48	26.9	ND	9.8	ND	II	Numerous little sclerotia (<500 µm)
J118a	<i>Aspergillus tamaritii</i>	Bhar al Kaal	10	brown	487.2	ND	ND	ND	ND	IV	-
J118b	<i>Aspergillus flavus</i>		20	++	41.5	ND	ND	ND	ND	IV	-
J119	<i>Aspergillus flavus</i>	Bhar al Kaal	10	+++	2635.2	77.1	< LOQ	ND	ND	I	-
J120	<i>Aspergillus flavus</i>	Bhar al Kaal	200	++	1534.2	<LOQ	ND	ND	ND	I	-
J8	<i>Aspergillus flavus</i>	Black pepper	10	++	ND	<LOQ	ND	ND	ND	III	-
J31	<i>Aspergillus flavus</i>	Black pepper	200	+++	24.7	ND	< LOQ	ND	ND	I	-
J31a	<i>Aspergillus tamaritii</i>		1000	brown	<LOQ	ND	ND	ND	ND	IV	-
J31b	<i>Aspergillus flavus</i>		800	++	46.2	ND	ND	ND	ND	IV	-
J31c	<i>Aspergillus flavus</i>		2000	++	108.7	172,8	ND	ND	ND	I	-
J33a	<i>Aspergillus flavus</i>	Black pepper	100	+	ND	ND	ND	ND	ND	V	-
J34a	<i>Aspergillus flavus</i>	Black pepper	100	+++	ND	ND	ND	ND	ND	V	-
J85	<i>Aspergillus flavus</i>	Caraway	5000	+++	ND	ND	ND	ND	ND	V	-
J4a	<i>Aspergillus tamaritii</i>	Chili	20	brown	389.3	ND	ND	ND	ND	IV	-
J4b	<i>Aspergillus flavus</i>		50	++	376.5	213.5	< LOQ	ND	ND	I	-
J4c	<i>Aspergillus flavus</i>		1000	(+)	ND	<LOQ	ND	ND	ND	III	-
J62a	<i>Aspergillus flavus</i>	Chili	2000	++	<LOQ	ND	ND	ND	ND	IV	-
J62b	<i>Aspergillus flavus</i>		200	++	<LOQ	ND	ND	ND	ND	IV	-
J63a	<i>Aspergillus flavus</i>	Chili	300	++	100.8	134	ND	ND	ND	I	-
J63c	<i>Aspergillus tamaritii</i>		400	brown	161.6	ND	ND	ND	ND	IV	-
J63d	<i>Aspergillus flavus</i>		300	+++	72.3	0.5	ND	ND	ND	I	-
J71a	<i>Aspergillus flavus</i>	Chili	1000	++	332.7	251.5	ND	ND	ND	I	-
J71b	<i>Aspergillus flavus</i>		2000	++	1148.4	193.1	< LOQ	ND	ND	I	-
J84a	<i>Aspergillus flavus</i>	Chili	2000	++	ND	145.3	ND	ND	ND	III	-
J84b	<i>Aspergillus flavus</i>		1000	++	ND	ND	ND	ND	ND	V	-
J53b	<i>Aspergillus flavus</i>	Coriander	100	++	76,7	ND	ND	ND	ND	IV	-
J76a	<i>Aspergillus flavus</i>	Coriander	200	++	<LOQ	ND	ND	ND	ND	IV	-
J76b	<i>Aspergillus flavus</i>		200	(+)	<LOQ	ND	ND	ND	ND	IV	-
J50	<i>Aspergillus flavus</i>	Cumin	100	(+)	ND	ND	ND	ND	ND	V	-
J6a	<i>Aspergillus tamaritii</i>	Curry	500	brown	327.2	ND	ND	ND	ND	IV	-
J6b	<i>Aspergillus flavus</i>		100000	++	199.5	318.5	< LOQ	ND	ND	I	-
J42a	<i>Aspergillus flavus</i>	Curry	400	++	ND	ND	ND	ND	ND	V	-
J42b	<i>Aspergillus flavus</i>		200	++	215.5	0.3	ND	ND	ND	I	-
J44a	<i>Aspergillus flavus</i>	Curry	200	++	ND	ND	ND	ND	ND	V	-
J69a	<i>Aspergillus flavus</i>	Curry	4000	++	243	76.5	ND	ND	ND	I	-
J7	<i>Aspergillus flavus</i>	Lebanese pepper	800	++	455.5	ND	ND	ND	ND	IV	Numerous small sclerotia (±500 µm)
J116a	<i>Aspergillus flavus</i>	Lebanese pepper	200	++	2607.3	30.1	< LOQ	ND	ND	I	-
J116b	<i>Aspergillus tamaritii</i>		10	Brown	1226	ND	ND	ND	ND	IV	-
J68a	<i>Aspergillus flavus</i>	Nutmeg	1000	+++	ND	ND	ND	ND	ND	V	-
J70	<i>Aspergillus flavus</i>	Nutmeg	1000	++	ND	53,1	ND	ND	ND	III	-
J86a	<i>Aspergillus flavus</i>	Nutmeg	1000	+	126.8	578.4	ND	ND	ND	I	Some big sclerotia (>500 µm)
J75a	<i>Aspergillus flavus</i>	Turmeric	500	+	ND	148.6	ND	ND	ND	III	-
J75c	<i>Aspergillus flavus</i>		200	+	ND	351.1	ND	ND	ND	III	-
J75g	<i>Aspergillus flavus</i>		100	+	125.4	124.6	ND	ND	ND	I	-
J75e	<i>Aspergillus flavus</i>		200	+	252.5	18.2	ND	ND	ND	I	-
J123a	<i>Aspergillus flavus</i>	Turmeric	200	+++	ND	ND	ND	ND	ND	V	-
J123b	<i>Aspergillus flavus</i>		300	++	388.1	ND	ND	ND	ND	IV	-
J37	<i>Aspergillus tamaritii</i>	White pepper	1000	Brown	75.2	ND	ND	ND	ND	IV	-

PD: Petri Dish

CFU: colony forming unit; AFPA: *Aspergillus flavus* and parasiticus Agar; CPA: cyclopiazonic acid

Chemotype I: AFB+/CPA+; Chemotype II: AFB+/ AFG+/CPA+; Chemotype III: AFB+; Chemotype IV: CPA+; Chemotype V: non-toxicogenic ND: Not detected

(< Limit of detection)

LOQ: limit of quantification

Conclusion des résultats

En conclusion, ce premier travail a permis de décrire, pour la première fois, la biodiversité des *Aspergillus* de la section *Flavi* retrouvés dans les épices commercialisées au Liban. Cette étude a mis clairement en évidence qu'*A. flavus* est l'espèce la plus fréquente parmi les échantillons analysés. Ce travail montre aussi que la proportion de souches toxigènes est importante. Cela souligne la nécessité de promouvoir les bonnes pratiques de stockage pour ce type de produit alimentaire, en particulier pour les épices qui résultent du mélange de différentes matières premières. L'usage de matériaux de conditionnement permettant d'éviter la contamination mais permettant aussi une bonne ventilation pourrait permettre d'améliorer la conservation des épices.

3.2. Biodiversité des *Aspergillus* section *Flavi* contaminant les céréales commercialisées au Liban

Les céréales, de par leur composition, sont des substrats particulièrement favorables à la croissance fongique et à la contamination mycotoxique (Lee *et al.*, 2017). Ces aliments représentent d'ailleurs la source principale d'exposition aux mycotoxines dans de nombreuses régions du monde.

Au Liban, la céréale la plus produite est le blé, avec environ 145000 tonnes récoltées chaque année (www.fao.org/faostat). L'orge représente 31000 tonnes alors que le maïs est moins produit, avec environ 3500 tonnes récoltées par an.

Il y a quelques années, une enquête réalisée sur le blé produit au Liban avait montré que cette céréale pouvait être contaminée par des souches d'*A. flavus* toxigènes ainsi que par des souches d'*A. ochraceus* (Joubrane *et al.*, 2011). Cependant, dans cette étude, le chemotype des souches isolées n'était pas précisé. De plus, le nombre d'espèces identifiées appartenant à la section *Flavi* était encore limité.

Ainsi, afin d'apporter des éléments complémentaires dans la connaissance des espèces fongiques pouvant contaminer les céréales produites au Liban, nous avons poursuivi notre étude en analysant 20 échantillons de céréales, constitués de 9 échantillons de maïs, 9 échantillons de blé et 2 échantillon d'orge. Trois de ces échantillons était destinés à l'alimentation animale alors que les autres étaient destinés à l'alimentation humaine.

3.2.1. Flore fongique totale des échantillons de céréales

Les céréales destinées aux animaux ont montré des énumérations fongiques classiques pour ce type de substrat avec une numération totale moyenne de $3,2 \cdot 10^4$ CFU/g.

En ce qui concerne les échantillons destinés à l'alimentation humaine, là encore, les valeurs moyennes sont normales à faibles (moyenne à $6,5 \cdot 10^3$ CFU/g). En effet, 5 échantillons de blé et 1 échantillon de maïs sont pratiquement stériles, ce qui suggère qu'ils ont fait l'objet d'un ou plusieurs traitements antifongiques.

Si on analyse maintenant la nature des genres fongiques observés en fonction des céréales, il apparaît que tous les échantillons de blé sont de très bonne qualité mycologique. Seules des traces de flore du champ sont observées (*Acremonium*, *Fusarium* et *Cladosporium*). Par contre, aucune souche d'*Aspergillus* n'a été détectée ainsi qu'aucune souche de Mucorales. Ces résultats suggèrent soit l'application d'un très bon séchage des grains avant stockage, soit de l'application d'un traitement antifongique. Ces résultats contrastent avec ceux de la seule étude disponible qui montrait la présence relativement fréquente (32% des échantillons) de souches d'*Aspergillus* de la section *Flavi* dans les échantillons de blé. Ces différences pourraient être liées à la période de prélèvement, aux lieux de prélèvement ainsi qu'aux pratiques agricoles, ayant pu évoluer depuis 2011. Il convient aussi de souligner que le faible nombre d'échantillons analysés dans notre étude ne permet pas de conclure quant à la qualité sanitaire globale du blé produit au Liban et qu'il conviendrait de confirmer ces résultats par la réalisation d'une enquête plus large.

Le seul échantillon de son de blé analysé présentait à la fois une flore du champ (*Acremonium*, *Fusarium* et *Alternaria*) et de stockage (*Hemispora*, *Aspergillus*) plutôt thermotolérante (*A. versicolores* et *A. candidi*). Une trace d'*Aspergillus* section *Flavi* a été observée (100 CFU/g).

Parmi les échantillons de maïs, deux ont montré un niveau de contamination supérieur aux autres avec un dénombrement supérieur à $6 \cdot 10^4$ CFU/g. Ces échantillons présentent une flore du champ et notamment des *Fusarium* de la section *Discolor* en nombre relativement important ($> 10^4$ CFU/g). Des espèces du genre *Aspergillus* ont aussi été observées, dont des isolats appartenant à la section *Flavi*.

Les autres échantillons de maïs présentaient des numérations plus faibles, avec un faible niveau de contamination par des *Aspergillus* de la section *Flavi*.

Comme pour le blé, 2 échantillons se sont avérés pratiquement stérile, laissant penser à l'application d'un traitement antifongique. Il semblerait intéressant de rechercher la nature des traitements appliqués afin de mieux comprendre les résultats obtenus lors des examens mycologiques.

Deux échantillons d'orge ont aussi été analysés. Celui à destination de l'alimentation animale présentait une qualité mycologique moyenne (numération totale $> 10^4$) avec une présence de mucorales (moisissures du genre *Rhizopus*, *Absidia* ou *Mucor*) pouvant signer une légère trace d'humid-

dité (défaut de séchage ou humidification en stockage). De nombreuses sections du genre *Aspergillus* ont été observées dans ces échantillons (7) dont des souches appartenant à la section *Fumigati* et à la section *Flavi*.

Dans l'échantillon destiné à l'alimentation humaine, la flore est comparable mais en quantité moins importante. Seules des traces d'*Aspergillus* de la section *Flavi* ont été observées.

L'ensemble des examens mycologiques des échantillons de céréales sont récapitulés dans les Tableaux 16, 17 et 18 ci-dessous.

Tableau 16 : Flore fongique des échantillons de maïs

Numéro des échantillons	Maïs								
	12*	13	14	15	91	92	93	94	95
État des échantillons	Concassé	Grain	Grain	Grain	Grain	Grain	Grain	Grain	Concasse
Origines des échantillons	Mezyara	Jbeil	Danniyeh	Koura	Bekaa	Koura	Borj Hammoud	Bekaa	Bekaa
<i>Aspergillus</i> section <i>flavi</i>	400	70	1200	60			300		
<i>Aspergillus</i> section <i>nigri</i>	2000								
<i>Aspergillus</i> section <i>aspergillus</i> (<i>Glaucus</i>)	500	300	2000						
<i>Aspergillus</i> section <i>candidi</i>	1000								
<i>Aspergillus</i> section <i>versicolores</i>			20000						
<i>Aspergillus</i> section <i>fumigati</i>		10							
<i>Aspergillus</i> section <i>Terrei</i>				100					
<i>Aspergillus</i> section <i>nidulantes</i>									
<i>Aspergillus</i> section <i>restricti</i>									
<i>Aspergillus</i> <i>ochraceus</i>									
<i>Aspergillus</i> section <i>wentii</i>									
<i>Fusarium</i>	50000		20000	200			4000	200	30000
<i>Penicillium</i>	4000	500	400	1000		600	100		
<i>Rhizopus</i>	1000	1000	100						
<i>Mucor</i>	2000			100					
<i>Absidia</i>		10							100
<i>Rhizomucor</i>									
<i>Syncephalastrum</i>									
<i>Acremonium</i>	1000		20000						
<i>Alternaria</i>		100							
<i>Cladosporium</i>	2100								
<i>Hemispora</i>	1000								
<i>Mycelium non sporulé</i>									
<i>Paecilomyces</i>									
<i>Scopulariopsis</i>		10							
<i>Spicaria</i>									
<i>Trichoderma</i>									
<i>Verticillium</i>									
Total (CFU/g)	65000	2000	63700	1460		600	4400	200	30100
Levures (/g)	100000		7000				2000		3000
	* aliments pour animaux								

Tableau 17 : Flore fongique des échantillons de blé

Numéro des échantillons	Ble							
	16	17	18	96	97	98	99	100
État des échantillons	Grain	Grain	Grain	Grain	Grain	Grain	Grain	Grain
Origines des échantillons	Danniyeh	Bekaa	Jbeil	Bekaa	Bekaa	Borj Hammoud	Koura	Jnoub
<i>Aspergillus section flavi</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Aspergillus section nigri</i>								
<i>Aspergillus section aspergillus (Glaucus)</i>								
<i>Aspergillus section candidi</i>								
<i>Aspergillus section versicolores</i>								
<i>Aspergillus section fumigati</i>								
<i>Aspergillus section Terrei</i>								
<i>Aspergillus section nidulantes</i>								
<i>Aspergillus section restricti</i>								
<i>Aspergillus ochraceus</i>								
<i>Aspergillus section wentii</i>								
<i>Fusarium</i>				200		300		
<i>Penicillium</i>	60	100						
<i>Rhizopus</i>								
<i>Mucor</i>								
<i>Absidia</i>								
<i>Rhizomucor</i>								
<i>Syncephalastrum</i>								
<i>Acremonium</i>		1000						
<i>Alternaria</i>						300		
<i>Cladosporium</i>	10	3000		1000				
<i>Hemispora</i>		400				200		
<i>Mycelium non sporulé</i>			10					
<i>Paecylomyces</i>								
<i>Scopulariopsis</i>								
<i>Spicaria</i>								
<i>Trichoderma</i>								
<i>Verticillium</i>								
Total (CFU/g)	70	4500	10	1200	X	800	X	X
Levures (/g)	X	40000	X	2000	20000	500		200

Tableau 18 : Flore fongique des autres échantillons de céréales

Numéro des échantillons	20*	19*	22
Nature des échantillons	Son de blé	Orge	Orge
État des échantillons	Poudre	Poudre	Poudre
Origines des échantillons	Mezyara	Mezyara	Jbeil
<i>Aspergillus section flavi</i>	110	1000	60
<i>Aspergillus section nigri</i>		10	10
<i>Aspergillus section aspergillus (Glaucus)</i>	500	3000	200
<i>Aspergillus section candidi</i>	4000	9000	200
<i>Aspergillus section versicolores</i>	200		10
<i>Aspergillus section fumigati</i>		2000	
<i>Aspergillus section Terrei</i>		1000	
<i>Aspergillus section nidulantes</i>		1000	
<i>Aspergillus section restricti</i>			
<i>Aspergillus ochraceus</i>			
<i>Aspergillus section wentii</i>	100		
<i>Fusarium</i>	1000	80	100
<i>Penicillium</i>	2000	1000	500
<i>Rhizopus</i>		100	100
<i>Mucor</i>	100	1000	200
<i>Absidia</i>	20	200	
<i>Rhizomucor</i>			
<i>Syncephalastrum</i>			
<i>Acremonium</i>	1000		
<i>Alternaria</i>	1000		
<i>Cladosporium</i>	1000		100
<i>Hemispora</i>	1000		
<i>Mycelium non sporulé</i>			
<i>Paecylomyces</i>			
<i>Scopulariopsis</i>			
<i>Spicaria</i>			
<i>Trichoderma</i>			
<i>Verticillium</i>			
Total (CFU/g)	12030	19390	1480
Levures (/g)	60000	50000	5000

3.2.2. Caractérisation des souches d'Aspergillus de la section Flavi isolées des échantillons de céréales

Au total, nous avons isolé 12 souches de la section *Flavi* à partir des 20 échantillons de céréales analysés. Dans tous les cas, ces souches étaient présentes à l'état de trace ou de très faibles dénombrements dans les échantillons.

On peut noter qu'aucune souche n'a été isolée à partir des échantillons de blé. Au contraire, 5 échantillons de maïs sur 9 étaient contaminés par 1 à 2 souches de la section *Flavi*. De même les deux échantillons d'orge et l'échantillon de son de blé étaient contaminés.

L'identification des souches au niveau de l'espèce a permis de montrer que toutes les souches isolées de céréales sont des *Aspergillus flavus*. Ce résultat est en accord avec les données bibliographiques qui rapportent généralement la présence de cette espèce dans les céréales et en particulier le maïs (Perrone et al., 2014). Comme attendu suite à cette identification, aucune des souches isolées n'est capable de produire des aflatoxines de type G. Trois sur les 12 produisent de l'Aflatoxine de type B et 8 sur 12 produisent de l'acide cyclopiazonique (Tableau 19 ci-dessous).

Tableau 19 : Potentiel toxigène des souches d'*Aspergillus* section *Flavi* isolées des échantillons de céréales

Céréales \ Chemotype	Nombre d'échantillons analysés (Échantillons positifs)	Nombre de souches	Chemotype	Chemotype	Chemotype	Chemotype	Chemotype
			I	II	III	IV	V
Mais	9 (5)	7	2/7	-	1/7	3/7	1/7
Blé	8 (0)	0	-	-	-	-	-
Orge	2 (2)	3	-	-	-	2/3	1/3
Son de Blé	1 (1)	2	-	-	-	1/2	1/2
Total	20	12	2/12	0/12	1/12	6/12	3/12

L'analyse de la flore fongique d'échantillons de céréales produites au Liban a ainsi permis de mettre en évidence :

- La faible contamination fongique globale des échantillons analysés. Ce constat est probablement associé à l'application de traitement sanitaires sur les grains ayant entraîné la disparition de la mycoflore. Compte tenu des effets possibles de traitements phytosanitaires sur la santé des consommateurs, il serait intéressant d'analyser la nature et les concentrations des produits utilisés. Une analyse de la teneur en ergostérol des échantillons stériles permettrait aussi de mieux situer à quelle étape du processus le traitement a eu lieu et les risques associés de présence de résidus de pesticides.
- Comme rapporté dans la littérature, c'est le maïs qui semble la céréale la plus à risque en ce qui concerne la présence d'*Aspergillus* section *Flavi*. Contrairement à la seule étude

antérieure disponible (Joubrane *et al.*, 2011), nous n'avons en effet pas observé la présence d'espèces de cette section dans les échantillons de blé analysés.

- Comme observé dans les épices, c'est *Aspergillus flavus* qui est l'espèce la plus fréquente, ce qui est en accord avec les études antérieures disponibles sur la microflore du maïs dans différentes régions du monde (Adeyoka *et al.*, 2018 ; Kachapulula *et al.*, 2017 ; Sebok *et al.*, 2016 ; Jedidi *et al.*, 2017 ; Mohale *et al.*, 2013).
- La proportion de souches toxigènes est importante, en particulier pour l'acide cyclopiazonique. Ces résultats sont cohérents avec une étude récente réalisée sur des souches isolées de différentes régions en Chine (Mamo *et al.*, 2018) et avec les résultats obtenus précédemment sur les échantillons d'épices.

3.3- Biodiversité des *Aspergillus* section *Flavi* contaminant les fruits secs commercialisés au Liban

Afin de compléter notre étude, nous avons aussi analysé la microflore d'échantillons de fruits secs commercialisés au Liban. En effet, certains fruits secs comme les arachides et les noix du Brésil sont des aliments particulièrement sensibles à la contamination par les aflatoxines et font l'objet de réglementations spécifiques dans de nombreux pays comme en Europe (Tableau 20 ci-dessous)

Contrairement aux céréales et en particulier au maïs, l'espèce la plus souvent décrite dans ces matrices est *Aspergillus parasiticus* (Kachapula *et al.*, 2017), qui se caractérise par sa capacité à produire des aflatoxines de type B et G mais pas d'acide cyclopiazonique (Horn, 2007).

Tableau 20: Teneurs maximales en aflatoxines tolérées dans les fruits secs en Europe (règlement 1881/2006)

Dérivées alimentaires	Teneurs maximales (µg/kg)		
	B1	Somme B1,B2,G1+G2	M1
Aflatoxines			
Arachides destinées à être soumises à un traitement de tri ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	8	15	—
Fruits à coque destinés à être soumis à un traitement de tri ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	5	10	—
Arachides, fruits à coque et produits dérivés de leur transformation, destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	2	4	—
Fruits séchés destinés à être soumis à un traitement de tri ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	5	10	—
Fruits séchés et produits dérivés de leur transformation, destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	2	4	—
Toutes les céréales et tous les produits dérivés des céréales, y compris les produits de céréales transformés	2	4	—
Maïs destiné à être soumis à un traitement de triage ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédient de denrées alimentaires	5	10	—
Lait cru, lait traité thermiquement et lait destiné à la fabrication de produits laitiers	—	—	0,05

Certains fruits secs sont largement produits au Liban, comme les amandes (32000 tonnes produites en 2016). D'autres productions sont plus modestes. C'est le cas des arachides (5500 tonnes en 2016) et les noix (3200 tonnes en 2016), en particulier si on compare avec la production d'autres pays comme le Brésil (560000 tonnes d'arachides produites en 2016) ou la côte d'ivoire (110000 tonnes d'arachides produites en 2016) (www.fao.org/faostat).

Dans cette étude, nous avons analysé 6 échantillons d'arachides, 5 échantillons d'amandes et 5 échantillons de noix. Nous avons aussi analysé la flore fongique de 3 échantillons de raisins secs. Bien entendu, le faible nombre d'échantillons ne permet pas d'avoir une image précise de la mycoflore pouvant être observée sur ce type d'aliment au Liban mais notre objectif était surtout d'évaluer la possible diversité des espèces fongiques observées sur ces substrats, par comparaison avec celles décrites précédemment sur les épices et sur les céréales, en particulier en ce qui concerne les *Aspergillus* de la section *Flavi*.

3.3.1. Flore fongique totale des échantillons de Fruit secs

Les échantillons d'arachide ont tous montré un dénombrement fongique global modéré (moyenne : $1,7 \cdot 10^3$ CFU/g). Dans ces échantillons, les *Penicillium* et les Mucorales sont assez fréquents mais observés à de faibles dénombrements. Des souches appartenant au genre *Aspergillus* ont été isolées de tous les échantillons mais à de faibles dénombrements. Cependant, ces souches présentent une forte diversité puisqu'elles appartiennent à 5 sections différentes (*Nigri*, *Flavi*, *Versicolores*, *Fumigati* et *Aspergillus*). Il s'agit d'espèces plutôt xérophiles et thermo-préférantes (Tableau 21)

Tableau 21 : Flore fongique des échantillons d'arachide

Numéro des échantillons	Arachide					
	23	25	29	104	105	106
État des échantillons	Grain et Coque	Sans coque	Sans coque	Grain	Grain (+coque)	Grain
Origines des échantillons	Koura	Akkar	Tripoli Andalos	Beirut	Jnoub	Koura
<i>Aspergillus section flavi</i>	100	200	X	X	X	X
<i>Aspergillus section niger</i>	100	40	10	400		
<i>Aspergillus section aspergillus (Glaucus)</i>	100	200				
<i>Aspergillus section candidi</i>						
<i>Aspergillus section versicolores</i>		100	100		200	
<i>Aspergillus section fumigati</i>						500
<i>Aspergillus section Terrei</i>						
<i>Aspergillus section nidulantes</i>						
<i>Aspergillus section restricti</i>						
<i>Aspergillus section wentii</i>						
<i>Fusarium</i>						
<i>Penicillium</i>		700		100	200	400
<i>Rhizopus</i>	4000	600				100
<i>Mucor</i>	1000		10			
<i>Absidia</i>						
<i>Syncephalastrum</i>						
<i>Acremonium</i>						
<i>Alternaria</i>				100		
<i>Cladosporium</i>		10	100			
<i>Hemispora</i>		1000				
<i>Mycelium non sporulé</i>						
<i>Paecilomyces</i>						
<i>Scopulariopsis</i>						
<i>Spicaria</i>						
<i>Trichoderma</i>						
<i>Verticillium</i>						
Total (CFU/g)	5300	2850	220	600	400	1000
Levures (/g)	X	X	X	X	X	X

L'analyse mycologique des échantillons d'amande a révélé un dénombrement moyen supérieur à celui des arachides ($8,8 \cdot 10^3$ CFU/g) avec trois échantillons dont le dénombrement dépasse 10^4 CFU/g. Les deux principaux genres fongiques retrouvés sont *Aspergillus* et *Penicillium*, qui sont présents dans tous les échantillons. Cependant, aucune souche appartenant à la section *Flavi* n'a été isolée. La présence quasi-systématique de mucorales montre la difficulté à sécher ces matrices riches en matières grasses et à conserver correctement ces denrées.

Le dénombrement fongique moyen des échantillons de noix est intermédiaire entre celui des arachides et celui des amandes ($6,6 \cdot 10^3$ CFU/g). Un échantillon est plus contaminé que les autres avec un fort dénombrement de *Penicillium* alors qu'un autre est stérile (dénombrement inférieur au seuil de détection : < 10 CFU/g). Ce dernier échantillon a subi un traitement post-récolte au Manèbe. Si on exclut cet échantillon de l'analyse mycologique globale, la contamination moyenne devient alors très similaire à celle observée sur les amandes ($8,2 \cdot 10^3$ CFU/g). *Penicillium* est le genre fongique dominant en fréquence et en importance. Seuls deux échantillons contiennent des *Aspergillus* : l'un avec des traces d'*Aspergillus* section *Aspergillus* et l'autre avec un faible dénombrement de *Nigri*.

Les amandes et les noix analysées ont donc un profil mycologique un peu similaire avec une sensibilité à la contamination fongique légèrement plus prononcée pour les amandes. Dans les 2 cas, la graine (amande ou noix) est protégée par un tégument et surtout une coque qui est sensée diminuer l'attaque des pathogènes, fongiques ou autres. On retrouve quand même une forte fréquence des genres *Penicillium* et *Aspergillus*, moisissures de stockage. Il est donc primordial de veiller à un bon séchage (difficile et long chez les graines oléagineuses) et à de bonnes conditions d'entreposage (endroit sec et aéré) et d'éviter au mieux les sources de contamination (lors de la récolte, du séchage, du décorticage et du stockage). La lutte contre les insectes « ensemenceurs » est également fondamentale.

Les 3 échantillons de raisins secs analysés se sont révélés « indemnes » de contamination fongique (< 10 CFU/g).

Ces 3 échantillons venaient de 3 régions différentes et tous les 3 ont subi le même traitement : une exposition prolongée au soleil. Ce procédé a permis à priori un excellent séchage et a ainsi évité tout développement fongique.

Il serait très intéressant d'approfondir cette modalité de séchage qui semble être particulièrement efficace.

3.3.2. Caractérisation des souches d'Aspergillus de la section Flavi isolées des échantillons de fruits secs

Seuls deux échantillons d'arachides étaient contaminés par des souches d'*Aspergillus* section *Flavi*, tous à faible dénombrement. Dans les deux cas, ces souches appartiennent à l'espèce *Aspergillus flavus*. Elles sont toutes deux capables de produire de l'acide cyclopiazonique mais pas d'aflatoxines (chemotype IV).

En conclusion de ces analyses, nous avons été relativement surpris de la très faible contamination par des *Aspergillus* de la section *Flavi* sur les échantillons analysés. Certes, le faible nombre d'échantillons ne permet pas de conclure quant à la qualité globale des fruits secs commercialisés au Liban, cependant, ces résultats posent néanmoins la question du rôle relatif d'éventuels traitements qui seraient appliqués aux produits avant commercialisation et/ou des pratiques agricoles utilisées et qui pourraient contrôler la contamination par ces espèces fongiques. Il serait intéressant d'analyser en détail les filières de production de ces aliments afin d'identifier les points clés permettant de contrôler la contamination fongique.

4. TRAVAIL COMPLEMENTAIRE : IMPACT DU MILIEU DE CULTURE SUR LA PRODUCTION DE SCLEROTES ET DE MYCOTOXINES

4.1. Contexte

Les sclérotés sont des structures de résistance produites par certaines souches de moisissures (figure 21). Leur production pourrait être associée à une augmentation de la production des mycotoxines. (Peterson et al., 2015).

Les souches produisant des sclérotés sont difficiles à identifier car les caractéristiques morphologiques spécifiques sont associées essentiellement aux têtes aspergillaires, parfois rares sur les colonies de telles souches. Elles sont aussi difficiles à conserver au laboratoire par les techniques classiques (conservation sur gélose en pente à 4°C ou suspension de spore dans du glycérol) à cause de leur très faible sporulation.

Nous avons donc décidé de réaliser un essai pour analyser l'effet milieu sur la production de sclérotés par une souche d'*Aspergillus minisclerotigenes*, fortement productrice de ces structures, et en parallèle, d'évaluer l'influence de la production de ces structures sur la production de mycotoxines.

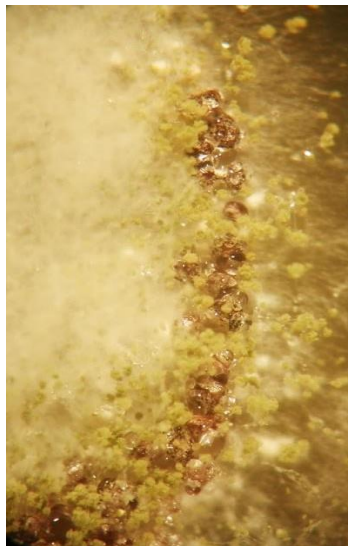


Figure 21 : Sclérotés produits par *Aspergillus minisclerotigenes*, vue à la loupe binoculaire (x 30)

4.2. Protocole expérimental

- Souche fongique : *Aspergillus minisclerotigenes* (J117c), isolées à partir d'un échantillon de Bhar al Kaak. Cette souche se caractérise par la production de nombreux sclérotés de petites tailles (< 400 µm) (figure 22)



Figure 22 : Aspect des sclérotés produits par la souche d'*Aspergillus minisclerotigenes* J117c et celles produites par la souche d'*Aspergillus flavus* J7 isolée du poivre libanais.

- Conditions de culture : cette souche a été cultivée pendant 14 jours à 25°C sur 10 milieux différents (MEA, Malt Salé, YES agar, PDA, MRS, Czapeck Oxoid, Czapeck Sigma, CYA, CMA et sabouraud)
- Analyses : à la fin de l'incubation, la production de sclérotés a été évaluée par examen macro- et microscopique des cultures. La production de mycotoxines (Aflatoxines B, G et ACP) a été évaluée comme décrit précédemment.

4.3. Résultats et discussion

La culture sur les différents milieux a permis de mettre en évidence un impact important sur la production de sclérotés par la souche J117c (figure 23).

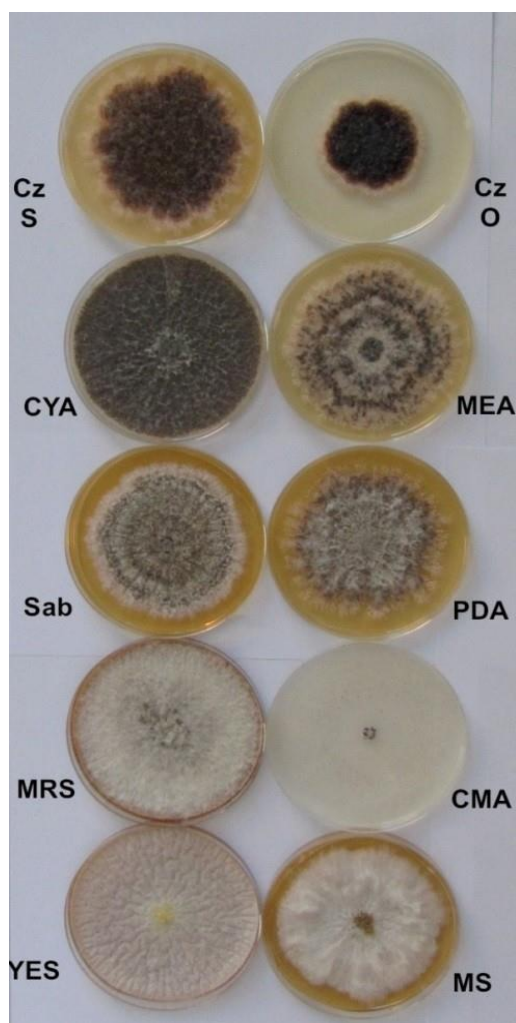


Figure 23 : Impact du milieu de culture sur la production de sclérotés par la souche J117c après 14 jours de culture à 25°C
L'aspect des colonies observées sur chaque milieu est décrit dans le tableau 22 ci-dessous.

Tableau 22 : aspect de la colonie d'*Aspergillus minisclerotigenes* après 14j à 25°C en fonction du milieu de culture

Milieu	Aspect de la colonie d' <i>Aspergillus minisclerotigenes</i>
CYA	Champ de sclérotés luisants (+++++) qui se touchent Petites gouttes d'exsudat sur sclérotés Mycélium aérien en toile d'araignée Quelques micro-têtes au centre; quelques têtes vertes en colonne Colonie très peu sporulée
PDA	Colonie en « étoile » Sclérotés ++++ gros avec des gouttes d'exsudat clair Mycélium aérien important et compact Quelques têtes vertes en colonne Colonie très peu sporulée
Sabouraud	Champ de sclérotés ++++ ; +/- matures, disposés en cocarde, à différents étages (micro-sclérotés dans mycélium aérien) Microgouttes d'exsudat très nombreuses, transparentes Couche de mycélium basal épais blanc sous les sclérotés, toile d'araignée en surface non sporulé Quelques grosses têtes vertes radiées + quelques têtes vertes en colonne Colonie très peu sporulée
MEA	Sclérotés ++++ disposés en cocarde ; «nid» de sclérotés au centre Grosses gouttes d'exsudat légèrement rosé Mycélium aérien abondant Quelques têtes vertes radiées + colonnes Colonie très peu sporulée
Czapek (Oxd)	Colonie très dense, épaisse Champ de sclérotés ++++ épais, englués ; quelques gros amas Couronne de sclérotés non matures puis matures Exsudat +++ ambre (orange marron rosé) Mycélium aérien + Quelques têtes vertes au centre en colonne
Czapek (Sigma)	Colonie étoilée Au centre, gros 8 sclérotés « mates » Exsudat ambre Colonie qui sporule un peu : 1/3 central dans mycélium aérien : têtes « ébouriffées »
CMA	Colonie transparente ; mycélium traçant basal fin Sclérotés ++ : matures ronds noirs + blancs Mycélium aérien très fin Exsudat en grosses gouttes rosé sur les sclérotés matures Rares têtes radiées jaune verte centre de la colonie + quelques-unes en périphérie
Malt Salé	Champ de sclérotés +++ sur toute la colonie mais à ≠ degré de maturité ; blancs + quelques noirs vers le centre Mycélium aérien important, très abondant Belles têtes aspergillaires au centre très sporulées, groupées + petites têtes en colonnes dans mycélium aérien
MRS	Champ de sclérotés ++++ à ≠ maturité : piqueté blanc (sclérote en formation), quelques-uns rosissent (exsudent) Mycélium aérien fin Rares grosses têtes sporulées jaune-vert en pompon + petites têtes vertes en colonne ou radiées
YES A	Surface velutina avec circonvolutions (« croûte de camembert ») Sclérotés -, puis quelques-uns blancs Mycélium aérien blanc fin Au centre, têtes aspergillaires jaune-verte bisériées, longues chaînes divergentes de spores + quelques petites têtes en colonne

Le milieu de culture influence donc fortement la production de sclérotés par la souche utilisée. D'un point de vue pratique, ces données sont importantes pour permettre la conservation de ce type de

souches au laboratoire. Ainsi, il apparaît que les milieux Malt salé et YES Agar permettent la production de têtes aspergillaires sporulées, favorables à la préparation de suspensions de spores et/ou à la conservation de la souche.

En parallèle, nous avons voulu évaluer la corrélation qui pouvait exister entre production de sclérote et mycotoxinogénèse.

Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau 23 ci-dessous.

Tableau 23 : Influence des conditions de culture d'une souche d'*Aspergillus* à sclérotés sur la synthèse de l'AFB1, AFG1 et ACP. Les résultats sont exprimés en µg de toxine/boîte de Petri.

Condition	Sclérotés	AFB1	AFG1	ACP
YES AGAR	-	51,28	12,96	3512,06
PDA	+++	4,89	2,70	993,74
Sabouraud	+++	4,22	2,762	2682,02
MALT	+++	26,86	9,84	1216,48
MALT SALE	++	21,693	48,30	488,07
MRS	++++	30,113	60,06	2742,59
Czapeck Oxoid	++++	11,498	40,79	814,28
Czapeck Sigma	++++	3,768	3,69	1998,19
CYA	+++++	42,714	81,72	2741,98
CMA	+	ND	ND	ND

ND : non détecté

Ces résultats montrent qu'il ne semble pas y avoir de corrélation directe entre la production de sclérote et la toxinogénèse. En effet, le milieu Yes Agar, qui ne permet pas la production de sclérotés est

l'un des plus favorable à la production d'AFB1 et d'ACP. Inversement, le milieu CMA, qui entraîne lui aussi une forte limitation de la production de sclérote n'a pas permis la production de toxine en quantité détectable dans le milieu. De même, le milieu CYA a entraîné la production d'aflatoxines B et G mais aussi d'ACP en grandes quantités, tout en s'accompagnant de la production d'un grand nombre de sclérotés.

Ce qui est aussi intéressant à noter, c'est que la proportion des différentes toxines produites change en fonction du milieu. Ainsi, sur milieux Malt salé, MRS et CYA, l'AFG1 est produite en quantité deux fois plus importantes que l'AFB1. Cette proportion est inversée sur les milieux PDA et sabouraud. Sur milieu Czapek obtenu chez Sigma, les deux toxines sont produites en quantité équivalentes alors que sur le milieu Czapek de chez Oxoid, ces deux toxines sont produites en quantités beaucoup plus importantes, et l'AFG1 est produite de façon plus importante que l'AFB1 (x 3,6). Il conviendrait d'analyser attentivement la composition détaillée de ces différents milieux pour voir si ces inflexions des voies métaboliques peuvent être associée à la présence de certains constituants.

Au final, le niveau de production des différentes toxines peut varier d'un facteur 10 en fonction du milieu. Ce constat est important à prendre en considération lorsqu'on s'attache à évaluer le risque sanitaire pouvant résulter de la présence de souches toxigènes dans les aliments. En effet, les conditions utilisées pour évaluer le potentiel toxigène des isolats peuvent fortement influencer les résultats obtenus. C'est aussi un élément très important lors de la description de nouvelles espèces et de leur capacité à produire différents métabolites secondaires. Ainsi, les résultats concernant le production de métabolites par les espèces récemment décrites de la section *Flavi* sont parfois contradictoires, peut-être en relation avec les conditions dans lesquelles les souches sont cultivées avant analyse.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abdulkadar, A.H.W., Al-Ali, A.A., Al-Kildi, A.M., & Al-Jedah, J. H. (2004). Mycotoxins in food products available in Qatar. *Food Control*, 15:543-548.
- Adebajo, L.O., Idowu, A.A. and Adesanya, O.O. (1994). Mycoflora, and mycotoxins production in Nigerian corn and corn-based snacks. *Mycopathologia* 126 (3) : 183-192
- Adjovi, Y., Bailly, S., Gnonlonfin, B.J.G., Tadrist, S., Querin, A., Sanni, A., Oswald, I.P., Puel, O. & Bailly, J.D. (2014). Contrast between natural occurrence of toxigenic *Aspergillii* of the *Flavi* section and Aflatoxin B1 in cassava: possible explanation. *Food Microbiol.* 38:151-159
- AFSSA. (2009). Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaines et animales. *Rapport Final*, 399p.
- Ahn, J., Kim, D., Jang, H.-S., Kim, Y., Shim, W.-B., and Chung, D.-H. (2010). Occurrence of ochratoxin A in Korean red paprika and factors to be considered in prevention strategy. *Mycotoxin Res.* 26:279-286.
- Aiko V., Meht, A. (2016). Prevalence of toxigenic fungi in common medicinal herbs and spices in India. *3 bio-tech* 6, 159, doi:10.1007/s13205-016-0476-9.
- Aleksic B, Bailly S, Draghi M et al (2016) Production of four macrocyclic trichothecenes by *Stachybotrys chartarum* during its development on different building materials as measured by UPLC-MS/MS. *Build Environ* 106:265-273
- Aline M. Katsurayamaa, Ligia M. Martinsa, Beatriz T. Iamanakaa, Maria Helena P. Fungarob, Josué J. Silvab, Jens C. Frisvadc, John I. Pittd, Marta H. Taniwakia. (2018). Occurrence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Brazilian rice: From field to market. *International Journal of Food Microbiology* 266:213-221
- Amaike, S. & Keller, N.P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual review of phytopathology*, 49, 107-33.
- Amani Lahouar, Ines Jedidi, Vicente Sanchis & Salem Saïd (2018) Aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenone in sorghum grains marketed in Tunisia, *Food Additives & Contaminants: Part B*, 11:2, 103-110
- Amani S., Shams-Ghahfarokhi M., Banasaz M., Razzaghi-Abyaneh M. (2012). Mycotoxin producing ability and chemotype diversity of *Aspergillus* section *flavi* from soils of peanut-growing regions in Iran. *Indian J. Microbiol.* 52:551-556.
- Ardic, M., Karakaya, Y., Atasever, M., and Durmaz, H. (2008). Determination of aflatoxin B1 levels in deep-red ground pepper (isot) using immunoaffinity column combined with ELISA. *Food Chem. Toxicol.* 46: 1596-11598.
- Armorini, S., Altafini, A., Zaghini, A. & Roncada, P. (2015). Occurrence of aflatoxin B1 in conventional and organic flour in Italy and the role of sampling. *Food Control*, 50:858-863.

- Arora R. G., Frolen H., Nilsson A. (1981). Interference of mycotoxins with prenatal development of the mouse. *Ada. Vet. Scand.* 22:524-534.
- Asghar M.A, Zahir E., Ranttila S., Ahmed A., Iqbal J. (2016). Aflatoxin in composite spices collected from local markets of Karachi, Pakistan. *Food Addit. Contam. Part B Surveillance* 9 :113-9.
- Assante, G., Camarda, L., Locci, R., Merlini, L., Nasini, G., Papadopoulos, E. (1981). Isolation and structure of red pigments from *Aspergillus flavus* and related species, grown on a differential medium. *J. Agric. Food Chem.* 29:785-787.
- Astoreca, A., Vaamonde, G., Dalcero, A., Ramos, A.J., Marín, S. (2012). Modelling the effect of temperature and water activity of *Aspergillus flavus* isolates from corn. *Int. J. Food Microbiol.* 156 (1): 60-67
- Aydin, A., Erkan, M. E., Başkaya, R., and Ciftcioglu, G. (2007). Determination of aflatoxin B1 levels in powdered red pepper. *Food Control* 18: 1015-1018.
- Ayerst, G. (1969). The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *Journal of Stored Products Research* 5:127-141.
- Badillet G., de Briève C., Guého E., (1987), *Champignons contaminants des cultures*,
- Balachandran, C., & Parthasarathy, K. R. (1996). Occurrence of cyclopiazonic acid in feeds and feedstuffs in Tamil Nadu, India. *Mycopathologia*, 133(3), 159-162.
- Bamba R., Sumbal, G. (2005). Co-occurrence of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid in sour lime *Citrus aurantiifolia* during post-harvest pathogenesis by *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia* 15 :407-411.
- Battilani, P., Toscano, P., Van der Fels-Klerx, H. J., Moretti, A., Camardo Leggieri, M., Brera, C., ... Robinson, T. (2016). Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific Reports*, 6, 24328. <http://doi.org/10.1038/srep24328>
- Battilani P, Giorni P, Bertuzzi T, Formenti S, Pietri A. (2006). Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. *Int J Food Microbiol.* 111:553-560.
- Battilani, P., Camardo Leggieri, M., Rossi, V. & Giorni, P. (2013). AFLA-maize, a mechanistic model for *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin B1 contamination in maize. *Computers and Electronics in Agriculture.* 9 : 38-46.
- Bbosa, G.S., Kitya, D. & Lubega, A. (2013). Review of the Biological and Health Effects of Aflatoxins on Body Organs and Body Systems. In *Aflatoxin - Recent Advances and Future Prospects*, 12: 240-265
- Becker-Algeri, T.A., Castagnaro, D., de Bortoli, K., de Souza, C., Drunkler, D.A. & Badiale-Furlong, E. (2016). Mycotoxins in Bovine Milk and Dairy Products: A Review. *Journal of Food Science*, 81(3): R544-52

Belli, N., Pardo, E., Marin, S., Farre, G., Ramos, A.J. and Sanchis, V. (2004). Occurrence of Ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture* 84: 541-546

Bennett J.W. et Klich M. (2003).- *Mycotoxins. Clinical Microbiology Review*, 16 :497-516.

Bennett, J. W. (Ed.). (2010). *An overview of the genus Aspergillus. Caister Academic*.

Betina V. *Structure-activity relationships among mycotoxins. Chem Biol Interact.* 1989;71:105-146. doi: 10.1016/0009-2797(89)90030-6.

Betina, V. (1989). *Mycotoxins. Chemical, biological and environmental aspects. Elsevier*.

Bhabhra, R., Askew, D.S. (2005). Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus. *Med. Mycol.* 43 (Suppl. 1) S87–S93

Bhat, R., Rai, R. V. & Karim, A.A. (2010). Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9:57–81.

Bhatnagar, D., Rajasekaran, K., Payne, G.A., Brown, R.L., Yu, J. & Cleveland, T.E. (2008). The 'omics' tools : genomics, proteomics, metabolomics and their potential for solving the aflatoxin contamination problem. *World Mycotoxin Journal*, 1 :3–12.

Bhatnagar, D., Payne, G. A., Cleveland, T. E., & Robens, J. F. (2004). Mycotoxins: current issues in USA. In *Meeting the mycotoxin menace* (pp. 17-47). Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.

Bircan, C., Barringer, S. A., Ulken, U., and Pehlivan, R. (2008). Aflatoxin levels in dried figs, nuts and paprika for export from Turkey. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43: 1492-1498

Bircan, C. (2005). The determination of aflatoxins in spices by immunoaffinity column extraction using HPLC. *Int. J. Food Sci. Technol.* 40: 929-934.

Blount, W.P. (1961). Turkey "X" disease. *J. Br. Turkey Fed.* 9, 55–58. Bhat, R., Rai, R.V., and Karim, A.A. (2010). Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9 :57-81.

Bokhari, F. M. (2007). Spices mycobiota and mycotoxins available in Saudi Arabia and their abilities to inhibit growth of some toxigenic fungi. *Mycobiol.* 35: 47-53.

Bonjar G.H.S. (2004). Incidence of aflatoxin producing fungi in early split pistachio nuts of Kerman, Iran. In: *Journal of Biological Sciences*, 4 :199-202.

- 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
- Burdock, G.A., Flamm, W.G. (2000). Review article: safety assessment of the mycotoxin cyclopiazonic acid. *International Journal of Toxicology* 19 :195–218
- Busby, W. F., Jr., & Wogan, G. N. (1984). in *Chemical Carcinogenesis* (Searle, C. E., Ed.) American Chemical Society, Washington, DC 2, 945-1 136.
- Cahagnier B., Richard-Molard D. (1998). Analyse mycologique in *Moisissures des aliments peu hydratés*, Ed. Tec & Doc :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/
- Cano-Sancho G, Sanchis V, Marín S, Ramos AJ. (2013). Occurrence and exposure assessment of aflatoxins in Catalonia (Spain). *Food Chem Toxicol.* 51:188–193.
- Carvajal-Campos, A., Manizan, A.L., Tadriss, S., Koffi-Akaki, D., Koffi-Nevry, R., Moore, G.G., Fapohunda, S.O., Bailly, S., Montet, D., Oswald, I.P., Lorber, S., Brabet, C. & Puel, O. (2017). *Aspergillus korhogoensis*, a novel aflatoxin producing species from the Côte d'Ivoire. *Toxins* 9, 353, doi: 10.3390/toxins9110353.
- Cary J.W., Ehrlich K.C. (2006). Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications. *Mycopathologia* 162 :167-177.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology). (2003). *Mycotoxins, Risks in Plant, Animal, and Human Systems*. Task force report. 139, ISBN N° 1–887383–22–0, pp200, Ames IOWA, USA
- Castegnaro M., Pfohl-Leszkwicz A, (2002). Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*, Lavoisier, Tec&Doc Chabane
- Centers for Disease Control and Prevention. (2004). Outbreak of aflatoxin poisoning-?-Eastern and Central provinces, Kenya. *MMWR.* 53: 790-793.
- Chala A, Taye W, Ayalew A, Krska R, Sulyok M, Logrieco A. (2015). Multimycotoxin analysis of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) and finger millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn.) from Ethiopia. *Food Control.* 45:29– 35.
- Chala, A., Mohammed, A., Ayalew, A., & Skinnis, H. (2013). Natural occurrence of aflatoxins in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) from eastern Ethiopia. *Food control*, 30(2), 602-605.

- Chang, P.-K., Ehrlich, K.C., Fujii, I.(2009). Cyclopiazonic acid biosynthesis of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Toxins (Basel)* 1 :74–99.
- Cheli, F.; Campagnoli, A.; Pinotti, L.; Fusi, E.; Dell’Orto, V. (2010). Sampling feed for mycotoxins: Acquiring knowledge from food. *Ital. J. Anim. Sci.* 8:5–22.
- Chen A.J., Hubka V., Frisvad J.C., Visagie C.M., Houbraken J., Meijer M., Varga J., Demirel R., Jurjevic Z., Kubatova A., Sklenar F., Zhou Y.G., Samson R.A. (2017). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Aspergillus* (formerly *Eurotium*) and its occurrence in indoor environments and food. *Stud. Mycol.* 88:37-135.
- Cheraghali AM, Yazdanpanah H, Doraki N, Abouhossain G, Hassibi M, Ali-abadi S. (2007). Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts. *Food Chem Toxicol.* 45(5):812–6. doi: 10.1016/j.fct.2006.10.026
- Cho, S.-H., Lee, C.-H., Jang, M.-R., Son, Y.-W., Lee, S.-M., Choi, I.-S., Kim, S.-H., and Kim, D.-B. (2008). Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. *Food Chem.* 107: 1283-1288.
- Colak, H., Bingol, E. B., Hampikyan, H., and Nazli, B. (2006). Determination of aflatoxin contamination in red-scaled, red and black pepper by ELISA and HPLC. *J. Food Drug Anal.* 14: 292-296.
- Cole, R.J. (1986). Etiology of turkey “X” disease in retrospect: a case for the involvement of cyclopiazonic acid. *Mycotoxin Res.* 2:3–7.
- Cotty, P.J. (1997). Aflatoxin producing potential of communities of *Aspergillus* section *Flavi* from cotton producing areas in the United States. *Mycol. Res.* 101 :698–704.
- Da Chagas O., Freire F., Kozakiewicz Z., Paterson R.M. (2000). Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia* 149 :13-19.
- De Hoog G.S., Guarro J. (1995). Atlas of clinical fungi, Centraalbureau voor champignons opportunistes, Atlas clinique et biologique, vol II, Ed VARIA, Paris
- Deabes, M.M., El-soud, N.H.A. & El-kassem, L.T.A. (2011.) In vitro inhibition of growth and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* strain (ATCC 16872) by various medicinal plant essential oils. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 1. diagnosis and epidemiology of fungal infections, 36(1):249-257
- Ding, X., Li, P., Bai, Y., Zhou, H. (2012). Aflatoxin B1 in post-harvest peanuts and dietary risk in China. *Food Control* 23 :143–148.
- Do, J.H., and Choi, D.K. (2007). Aflatoxins: detection, toxicity, and biosynthesis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 12:585–593.

- Dong-Ho Kim, Sung-Yong Hong, JeaWoo Kang, Sung Min Cho, Kyu Ri Lee, Tae Kyung An, Chan Lee, and Soo Hyun Chung. (2017). Simultaneous Determination of Multi-Mycotoxins in Cereal Grains Collected from South Korea by LC/MS/MS. *Toxins* 9 :106 doi:10.3390/toxins9030106
- Druzhinina, I.S., Kopchinskiy, A.G., Komon-Zelazowska, M. (2005). An oligonucleotide barcoden for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet. Biol.* 42 : 813-828
- Duverger, F., Bailly, S., Querin, A., Pinson-?Gadais, L., Guerre, P., and Bailly, J. (2011). Influence of culture medium and incubation time on the simultaneous synthesis of deoxynivalenol and zearalenone by *Fusarium graminearum*. *Revue Méd. Vét* 162 :93–97.
- Eaton D.L., Groopman J.D.(1994). The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance. San Diego: Academic Press.
- El Khoury A, Rizk T, Lteif R, Azouri H, Delia M-L, Lebrihi A. (2006). Occurrence of ochratoxin A- and aflatoxin B1-producing fungi in Lebanese grapes and ochratoxin A content in musts and finished wines during 2004. *J Agric Food Chem.* 54:8977–8982.
- El Mahgubi A., Puel O., Bailly S., Tadriss S., Querin A., Ouadia A., Oswald I.P., Bailly J.D. (2013). Distribution and toxicogenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in spices marketed in Morocco. *Food Contr.* 32:143–148
- Emara, S., Razee, S., Khedr, A., & Masujima, T. (1997). On-line precolumn derivatization for HPLC determination of methotrexate using a column packed oxidant. *Biomedical Chromatography*, 11(1), 42-46.
- European Commission. RAFF – Food and Feed Safety Alerts. "https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en" https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en
- European Union. (2006). Commission regulation 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Europ. Un.* L364:5-24
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2007). International Conference on Organic Agriculture and Food Security. Report. Rome 3–5 May 2007.
- FAO .(2004). Food and Agriculture Organization, Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO, Food and Nutrition Paper N° 81. Rome, Italy.
- FAO/WHO. (1999). 49th JECFA Meeting. Evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva
- Fernandez Pinto V., Patriarca A., Locani O., Vaamonde G. (2001). Natural co-occurrence of aflatoxin and cyclopiazonic acid in peanuts grown in Argentina. *Food Addit. Contam.* 18 :1017-1020.

- Fernane, F., Cano-Sancho, G., Sanchis, V., Marin, S., & Ramos, A. J. (2010). Aflatoxins and ochratoxin A in pistachios sampled in Spain: occurrence and presence of mycotoxigenic fungi. *Food Additives and Contaminants*, 3(3), 185-192.
- Fernane, F., Sanchis, V., Marin, S., & Ramos, A. J. (2010). First report on mould and mycotoxin contamination of pistachios sampled in Algeria. *Mycopathologia*, 170(6), 423-429.
- Feroz F., Shimizu H., Nishioka T., Mori M., Sakagami Y. (2016). Bacterial and fungal counts of dried and semi-dried foods collected from Dhaka, Bangladesh and their reduction methods. *Biocontrol Sci.* 21 :243-251.
- Feuilhade de Chauvin M., (2005), New diagnostic techniques, *J. Eur. Acad. Dermatol.*
- Filtenborg, O., Frisvad, J. C., and Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage, *Int. J. Food Microbiol.* 33:85-102
- Forrester, L.M., Neal, G.E., Judah, D.J., Glancey, M.J., and Wolf, C.R. (1990). Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B1 metabolism in human liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 :8306–8310.
- Fremy JM. (1982). Aflatoxines et produits laitiers. *Bull Lab Vét*, 6 :57-64.
- Frisvad, J. C. (2012). Media and growth conditions for induction of secondary metabolite production. In *Fungal Secondary Metabolism* (pp. 47-58). Humana Press, Totowa, NJ.
- Frisvad J.C., & Samson R.A. (2004b). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud. Mycol.* 49:1–174.
- Frisvad J.C., Samson R.A. (2004a). *Emericella venezuelensis*, a new species with stellate ascospores producing sterigmatocystin and aflatoxin B 1. *Syst. Appl. Microbiol.* 27:672–680.
- Frisvad JC, Samson RA. (2000). *Neopetromyces* gen. nov. and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subg. *Circumdati*. *Stud Mycol* 45:201–207
- Frisvad JC, Skouboe P, Samson RA. (2005). Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 28:442–453
- Fu, Z., Huang, X. & Min, S. (2008). Rapid determination of aflatoxins in corn and peanuts. *J. Chromatogr. A* 1209:271–274. doi:10.1016/j.chroma.2008.09.054
- Galal HA. (2017). Evaluation of aflatoxin contamination and quality of nuts in Egyptian markets and after cold storage. *Menoufia J Plant Prod.* 2:169–176

- Galtier, P., Loiseau, N., Oswald, I.P., and Puel, O. (2006). Toxicologie des mycotoxines: dangers et risques en alimentation humaine et animale. *Bulletin De l'Académie Vétérinaire De France* 159:5–13.
- García-Rico R., Gil-Durán C., Rojas-Aedo J. F., Vaca I., Figueroa L., Levicán G., et al. (2017). Heterotrimeric G protein alpha subunit controls growth, stress response, extracellular protease activity, and cyclopiazonic acid production in *Penicillium camemberti*. *Fungal Biol.* 121:754–762. doi:10.1016/j.funbio.2017.05.007
- Geisen, R., Mayer, Z., Karolewicz, A. and Farber, P. (2004). Development of a Real Time PCR System for detection of *Penicillium nordicum* and for Monitoring Ochratoxin A production in foods by targeting the ochratoxin polyketide synthase gene. *System. Appl. Microbiol.* 27: 501-504
- Geiser, D.M., Klich M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J., Samson, R.A. (2007). Current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud Mycol* 59:1–10
- Geiser, D. M., del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., ... & O'donnell, K. (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110(5-6), 473-479.
- Georgiadou, M., Dimou, A., and Yanniotis, S. (2012). Aflatoxin contamination in pistachio nuts: A farm to storage study. *Food Control* 26:580–586.
- Gibb H., Devleeschauwer B., Bolger P.M., Wu F., Ezendam J., Cliff J., Zeilmaker M., Verger P., Pitt J., Baines J., Adegoke G., Afshar R., Liu, Y., Bokkers B., Van Loveren H., Mengelers M., Brandon E., Havelaar A.H., Bellinger D. (2015). World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of four foodborne chemical toxins, 2010: a data synthesis. *F1000Research* 4:1-14
- Gibson, A.M., Baranyi, J., Pitt, J.I., Eyles, M.J., and Roberts, T.A. (1994). Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiol.* 23:419–431.
- 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.
- Girardin H., Latgé J. P., Srikantha T., Morrow B., Soll D. R. (1993). Development of DNA probes for fingerprinting *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 31:1547-1554.
- Gonçalez, E., Nogueira, J. H. C., Fonseca, H., Felicio, J. D., Pino, F. A., & Corrêa, B. (2008). Mycobiota and mycotoxins in Brazilian peanuts kernels from sowing to harvest. *International Journal of Food Microbiology*, 123:184–190.
- Gonçalves, S.S., Stchigel, A.M., Cano, J.F., Godoy-Martinez, P.C., Colombo, A.L., and Guarro, J. (2012). *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section *Flavi*. *Med. Mycol.* 50:152-160.

- Gong, Y., Hounsa, A., Egal, S., Turner, P.C., Sutcliffe, A.E., Hall, A.J., Cardwell, K., and Wild, C.P. (2004). Post- weaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: a longitudinal study in Benin, West Africa. *Environmental Health Perspectives* 112:1334-1338.
- Gong, Y.Y., Cardwell, K., Hounsa, A., Egal, S., Turner, P.C., Hall, A.J., and Wild, C.P. (2002). Dietary aflatoxin exposure and impaired growth in young children from Benin and Togo: cross sectional study. *BMJ* 325: 20– 21.
- Goto T., Wicklow D.T., Ito Y. (1996). Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by sclerotium producing *Aspergillus tamarii* strain. *Appl. Environment. Microbiol.* 62:4036-4038.
- Guezlane-Tebitel N., Bouras N., Mokrane S., Benayad T., Mathieu F. (2012). Aflatoxigenic strains of *Aspergillus section Flavi* isolated from marketed peanuts (*Arachis hypogaea*) in Algiers (Algeria). *Ann. Microbiol.* 62: 1- 11.
- H. S.Chun,H. J.Kim,H. E.Ok, J. B.H wang, and D.H.Chung. (2007). "Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in SouthKorea," *FoodChemistry*, vol. 102(1): 385–391.
- Hall A.J., Wild C.P.(1994). Epidemiology of aflatoxin-related disease. *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance*. Ed.: Eaton, D. L., Groopman, J. D. Academic press INC., London, 233-258.
- Hamidi, A., Mirnejad, R., Yahaghi, E., Behnod, V., Mirhosseini, A., Amani, S., Sattari, S. & Darian, E.K. (2013). The aflatoxin B1 isolating potential of two lactic acid bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3:732–736.
- Hashem M., Alamri S. (2010). Contamination of common spices in Saudi Arabia markets with potential myco- toxin producing fungi. *Saudi J. Biol. Sci.* 17:167-175.
- Hedayati MT, Omran SM, Soleymani A, Armaki M. (2016). Aflatoxins in food products in Iran: A review of the literature. *Jundishapur J Microbiol*, 9(7): e33235.
- Hedayti, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P., and Denning, D.W. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153:1677-1692.
- Hell, K., Gnonlonfin, B. G. J., Kodjogbe, G., Lamboni, Y., and Abdourhamane, I. K. (2009). Mycoflora and occurrence of aflatoxin in dried vegetables in Benin, Mali and Togo, West Africa. *Int. J. Food Microbiol.* 135: 99- 104.
- Hierro, J. M. H., Garcia-Villanova, R. J., Torrero, P. R., and Fonseca, I. M. T. (2008). Aflatoxins and ochratoxin A in red paprika for retail sale in Spain: occurrence and evaluation of a simultaneous analytical method. *J. Agric. Food Chem.* 56: 751-756.

- Hinrikson H.P., Hurst S.F., De Aguirre L., Morrison C.J. (2005).
- Holmquist, G.U., Walker, H.W., and Stahr, H.M. (1983). Influence of Temperature, pH, Water Activity and Antifungal Agents on Growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Journal of Food Science* 48: 778–782.
- Hong, S.B., Go, S.J., Shin, H.D., Frisvad, J.C., Samson, R.A. (2005). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia* 97:1316-1329.
- Hsieh, D.P.H., Salhab, A.S., Wong, J.J., and Yang, S.L. (1974). Toxicity of aflatoxin Q1 as evaluated with the chicken embryo and bacterial auxotrophs. *Toxicology and Applied Pharmacology* 30:237–242.
- Hussein, H.S., and Brasel, J.M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167:101–134.
- Hymery N., Masson F., Barbier G., Coton E. (2014). Cytotoxicity and immunotoxicity of cyclopiazonic acid on human cells. *Toxicol. in Vitro* 28:940-947.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. (2002). Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans, vol. 82. World Health Organization, IARC, Lyon, France
- 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 humans, World Health Organization, Lyon. 56:245.
- Iqbal, S.Z., Paterson, R.R.M., Bhatti, I.A., Asi, M.R., Sheikh, M.A., and Bhatti, H.N. (2010). Aflatoxin B1 in chillies from the Punjab region, Pakistan. *Mycotoxin Res.* 26: 205-209.
- Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D.T., Goto, T. (2001). *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section Flavi. *Mycol. Res.* 103:233- 239.
- Jalili, M., and Jinap, S. (2012). Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in commercial dried chili. *Food Control* 24: 160-164.
- Jarvis, B.B. & Miller, J.D. (2005). Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 66:367–372.
- Jedidi I, Cruz A, Gonzalez-Jaen MT, Said S. (2017). Aflatoxins and ochratoxin A and their *Aspergillus* causal species in Tunisian cereals. *Food Addit Contam Part B.* 10(1):51–58.
- Jeswal P., Kumar D. (2015). Mycobiota and natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A and citrinin in Indian spices confirmed by LC-MS/MS. *Int. J. Microbiol.* Article ID 242486, 8 pages, doi:10.1155/2015/2424862015.

- Jiang, Y., Jolly, P.E., Ellis, W.O., Wang, J.S., Phillips, T.D., and Williams, J.H. (2005). Aflatoxin B1 albumin adduct levels and cellular immune status in Ghanaians. *International Immunology* 17: 807–814.
- 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
- Juan, C., Zinedine, A., Moltó, J.C., Idrissi, L. & Mañes, J. (2008) Aflatoxins levels in dried fruits and nuts from Rabat-Salé area, Morocco. *Food Control*. 19:849–853.
- Kaba, B., Dobson, D.W. (2017). Mycotoxins in spices and herbs: an update. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57: 18-34.
- Kanbur, M., Liman, B. C., Eraslan, G., and Altınordulu, Ş. (2006). Quantitative analysis of aflatoxin B1 by enzyme immunoassay (EIA) in red pepper marketed in Kayseri. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Erciyes* 3: 21-24.
- Kara, G.N., Ozbey, F. & Kabak, B. (2015). Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in cereal flours commercialised in Turkey. *Food Control*. 5: 275–281.
- Kaya-Celiker, H., Mallikarjunan, P.K., Kaaya, A. (2015). Mid-infrared spectroscopy for discrimination and classification of *Aspergillus* spp. contamination in peanuts. *Food Control* 52:103–111
- 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
- Khazaeli. (2017): Prevalence of Aflatoxin Contamination in Herbs and Spices in Different Regions of Iran P. Iran *J Public Health*. 46.(11):1540-1545 Original
- King E.D., Bassi A.B., Ross D.C., Druebbisc B. (2011). An industry perspective of the use of "atoxigenic" strains of *Aspergillus flavus* as biological control agent and the significance of cyclopiazonic acid. *Toxin Rev.* 30:33- 41.
- Klich, M.A. (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular plant pathology*, 8: 713–22.
- Klich, M.A. (2002). Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia*, 94: Knaw, Utrecht, The Netherlands.
- Klich M.A., Mullaney E.J., Daly C.B., Cary J.W. (2000). Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus tamarii* and *A. ochraceoroseus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53:605-609.
- Klich, M. A. & Pitt, J. L. (1988). Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Trans Br Mycol Soc* 91: 99–108.

- Kneifel W., Berger E. (1994). Microbiological criteria of random samples of spices and herbs retailed on the Austrian market. *J. Food Protect.* 57:893-901.
- Kopchinsky A, Komon K, Kubicek CP, Druzhinina I (2005) Trichoblast: a multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Mycol Res* 109:657–660
- Kos, J., Mastilović, J., Hajnal, E.J. & Šarić, B. (2013). Natural occurrence of aflatoxins in maize harvested in Serbia during 2009-2012. *Food Control*, 34:31–34.
- Krska, R. & Crews, C. (2008). significance, chemistry and determination of ergot alkaloids: a review. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment.* 25: 722–731.
- Kumagai, S. (1989). Intestinal absorption and excretion of aflatoxin in rats. *Toxicology. Applied. Pharmacol- ogy.* 97:88–97.
- Kursun, O., and Mutlu, A. G. (2010). Aflatoxin in spices marketed in the west Mediterranean region of Turkey. *J. Anim. Vet. Adv.* 9: 2979-2981.
- Kurtzman, C.P., Horn, B.W., Hesseltine, C.W. (1987). *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Ant. Van Leeuwenhoek* 53: 147-158.
- Kwon Chung K.J., Bennett J.E., (1992), *Medical mycology*, Lea and Febiger, London
- Laakso JA, Narske ED, Gloer JB, Wicklow DT, Down PF (1994) Isokotanins A-C: new bicoumarins from the sclerotia of *Aspergillus alliaceus*. *J Nat Prod* 57:128–133
- Lacey, J. (1989). Prevention of Mold growth and mycotoxin production through control of environmental factors. In: Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y. eds. *Mycotoxins and phycotoxins*. Elsevier, Amsterdam. 88:161– 168
- Lahouar, A., Marin, S., Crespo-Sempere, A., Saïd, S., & Sanchis, V. (2016). Efectos de la temperatura, la actividad de agua y el tiempo de incubación en el crecimiento fúngico y la producción de aflatoxina B1 por aislados toxicogénicos de *Aspergillus flavus* en sorgo. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(1):78–85
- Lansden, J.A., Davidson, J.I. (1983). Occurrence of cyclopiazonic acid in peanuts. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 766–769.
- Laprade, J.C., Manwiller, A. & Carolina, S. (1977). Relation of Insect Damage, Vector, and Hybrid Reaction to Aflatoxin B1 Recovery from Field Corn. *Phytopathology*, 67:544–547.
- Latgé J-P. (1991). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 12(2):310-50

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, J. B. (1990). Detection and occurrence of cyclopiazonic acid in cheeses. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 10(3), 136-137.

Lebanese food standards regulation (LIBNOR) n°622/2003 for fixing maximal authorized levels of aflatoxins in some of the foodstuffs

Liorens, A., Mateo, R., Hinojo, M. J., Valle-Algara, F. M. & Jimenez, M. (2004). Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. From Spanish crops. *International Journal of Food Microbiology* 94: 43-53

Liu Q., Meng X., Zhao C.N., Tang G.Y., Li H.B. (2017). Antibacterial and antifungal activities of spices. *Int. J. Mol. Sci.* 18-1283, doi: 10.3390/ijms18061283

Liu, J., Sun, L., Zhang, J., Guo, J., Chen, L., Qi, D. & Zhang, N. (2016). Aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in feed ingredients and complete feed from central China. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 3210:1–7.

Liu Y., Wu F. (2010). Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 118:818-824.

Ljilja Torović. (2018). Aflatoxins and ochratoxin A in flour: a survey of the Serbian retail market, *Food Additives & Contaminants: Part B*, 11:1,26-32, DOI: 10.1080/19393210.2017.1391335

Luchese R.H., Harrigan W.F. (1993). Biosynthesis of aflatoxin – the role of nutritional factors, *J. Appl. Bacteriol.*, 74:5-14

Mandeeel Q.A. (2005). Fungal contamination of some imported spices. *Mycopathologia*, 159:291-298.

Maragos, C. M., Sieve, K. K., & Bobell, J. (2017). Detection of cyclopiazonic acid (CPA) in maize by immunoassay. *Mycotoxin research*, 33(2), 157-165.

Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218-237.

Martins LM, Anderson SS, Pelegrinelli Fungaro ME, Silva JJ, da Silva do Nascimento M, Frisvad JC, Hiromi Taniguchi M. (2017). The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in the Brazilian peanut production chain. *Food Res Int.* 94:101–107.

Masri, M.S., Haddon, W.F., Lundin, R.E., and Hsieh, D.P.H. (1974). Aflatoxin Q1. Newly identified major metabolite of aflatoxin B1 in monkey liver. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 22: 512–515.

Matumba, L., Monjerezi, M., Biswick, T., Mwatseteza, J., Makumba, W., Kamangira, D. & Mtukuso, A. (2014). A survey of the incidence and level of aflatoxin contamination in a range of locally and imported processed foods on Malawian retail market. *Food Control*, 39:87–91.

McLean, M., and Dutton, M.F. (1995). Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: An update. *Pharmacology & Therapeutics* 65:163–192

Mehrzad, J., Klein, G., Kamphues, J., Wolf, P., Grabowski, N., and Schuberth, H.J. (2011). In vitro effects of very low levels of aflatoxin B1 on free radicals production and bactericidal activity of bovine blood neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 141:16–25.

Mellon, J.E., Cotty, P.J. & Dowd, M.K. (2007). *Aspergillus flavus* hydrolases: Their roles in pathogenesis and substrate utilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77:497–504.

Ministère de l'Agriculture. (2007) et (2010) . Résultats globaux du Recensement Agricole, 2007. Stratégie et politique agricole. Direction des études et de la coordination. Rapports de synthèse, filières de la production végétale et animale, Liban. "<http://www.agriculture.gov.lb>"

Ministère du Commerce (2007) et (2009). Direction Générale de l'Office des céréales et de la betterave sucrière OCBS, Liban. "<http://www.economy.gov.lb>" www.economy.gov.lb

Mitchell D., Parra R., Aldred D. et Magan N. (2004). Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology*, 97:439–445.

Mngqawa, P., Shephard, G.S., Green, I.R., Ngobeni, S.H., de Rijk, T.C. & Katerere, D.R. (2016). Mycotoxin contamination of home-grown maize in rural northern South Africa (Limpopo and Mpumalanga Provinces). *Food Additives & Contaminants: Part B*. 9:38–45.

Mohamed, S., Mo, L., Flint, S., Palmer, J., & Fletcher, G. C. (2012). Effect of water activity and temperature on the germination and growth of *Aspergillus tamarii* isolated from "Maldivian fish". *International journal of food microbiology*, 160(2), 119-123

Mohana, D.C., Thippeswamy, S., Abhishek, R.U. & Manjunath, K. (2014). Natural occurrence of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*, and AFB1 and FB1 contamination in maize grown in Southern Karnataka (India). 2:17–20.

- Molina, M., and Giannuzzi, L. (2002). Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. *Food Research International* 35:585–594.
- Morin O. (1994). *Aspergillus et aspergilloses: biologie*, Ed. Techniques Encyl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Mal- adies infectieuses 8-600-A-10 Morno-Martinez
- Mphande, F. A., Siame, B. A., & Taylor, J. E. (2004). Fungi, aflatoxins, and cyclopiazonic acid associated with peanut retailing in Botswana. *Journal of Food Protection*, 67(1), 96-102
- Ngindu, A., Kenya, P., Ocheng, D., Omondi, T., Ngare, W., Gatei, D., Johnson, B., Ngira, J., Nandwa, H., Jansen, A., et al. (1982). OUTBREAK OF ACUTE HEPATITIS CAUSED BY AFLATOXIN POISONING IN KENYA. *The Lancet* 319: 1346–1348.
- Northolt M. D. et Bullerman L .B. (1982). Prevention of mould growth and toxin production through control of environmental conditions. *Journal of Food Protection*. 45:519–26
- AitMimoune N., Arroyo-Manzanares N., Gámiz-Gracia L., García-Campaña AM., Bouti K., Sabaou N and Riba A. (2018). *Aspergillus* section Flavi and aflatoxins in dried figs and nuts in Algeria, *Food Additives & Contami- nants: Part B*, 11:2, 119-125.
- Ok, H.E., Kim, H.J., Shim, W.B., Lee, H., Bae, D.H., Chung, D.-H., and Chun, H.S. (2007). Natural occurrence of aflatoxin B1 in marketed foods and risk estimates of dietary exposure in Koreans. *J. Food Prot.* 70:2824–2828.
- Okeke, O.F.I., Fapohunda, S., Soares, C., Lima, N. & Ayanbimpe, G.M. (2015). Mycotoxin Contamination of Maize and Guinea corn from Markets in Plateau State, Nigeria. *Mycotoxicology Society of Nigeria*, 2:28–34.
- Olutiola, P.O. (1976). Cellulase enzymes in culture filtrates of *Aspergillus flavus*. *Trans Br Mycol Soc.* 67:265– 268
- Omer R.E., Kuijsten A., Kadaru A.M., Kok F.J., Idris M.O., EL K., I, Van V. (2004). Population attributable risk of dietary aflatoxins and hepatitis B virus infection with respect to hepatocellular carcinoma. *Nutr.Cancer*, 48:15-21.
- Ortega, Y.R. (2008). Foodborne Diseases. *Emerging infectious diseases*, 14, 1181 .
- Ostadrahimi A, Ashrafnejad F, Kazemi A, Sargheini N, Mahdavi R, Farshchian M. (2014). Aflatoxin in raw and salt-roasted nuts (pistachios, peanuts and walnuts) sold in markets of tabriz, iran. *Jundishapur J Microbiol.* 7(1):8674. doi: 10.5812/jjm.8674. [PubMed: 25147653].
- Paris S., Sarfati J., Shibuya K., Sullivan D., Uchida K., Yamaguchi H., (1998), *Molecular*
- Paterson, R.R.M. (2007). Aflatoxins contamination in chilli samples from Pakistan. *Food Control* 18:817-820.

- Perrone G., Haidukowsk M., Stea, G., Epifani F., Bandyopadhy R., Leslie, JF., Logrieco A. (2014). Population structure and aflatoxin production by *Aspergillus section Flavi* from maize in Nigeria and Ghana. *Food Micro- biol.* 41:52-59.
- Perry, J. J., Staley J. T., and S. Lory. (2004). *Microbiologie*. Dunod. France.
- Peterson S. W. (2008). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* 100:205-226.
- Peterson S.W. (2006). Multilocus sequence analysis of *Penicillium* and *Europicillium*
- 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
- Pfohl-Leszkowicz A. (1999).- Ecotoxicogénèse. in : *Les mycotoxines dans l'alimentation, évaluation et gestion du risqué*, Ed. TEC et DOC, Lavoisier, Paris, 17–35.
- Pier, A.C. (1992). Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. *Journal of Animal Science* 70:3964–3967.
- Pildain, M. B., Frisvad, J. C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J., & Samson, R. A. (2008). Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(3), 725-735
- Pitt J.I., Lange L., Lacey A.E., Vuong D., Midgley D.J., Greenfield P., Bradbury M.I., Lacey E., Busk P.K., Pilgaard B., Choo Y.H., Piggott, A.M. (2017). *Aspergillus hancockii* sp. nov., a biosynthetically talented fungus endemic to southeastern Australian soils. *PLoS One* 12:e0170254.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*, thirded. Springer Science+Business Media, New York.
- Pitt J.I., Basilico J.C., Abarca M.L et Lopez C. (2000).- Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*, 38:41–46.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (1997). *Aspergillus* and related teleomorphs. In *Fungi and food spoilage* (pp. 339- 416). Springer, Boston, MA
- Pitt, J.L. (1988). *Laboratory guide to common Penicillium species*. Academic Press, London
- Pitt J.I., Hocking A.D. Glenn D. R. (1983). An improved medium for detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *J. Appl. Bacteriol.* 54:109–114.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. (1977). Influence of solute and hydrogen ion concentration on the water relations of some xerophilic fungi. *Journal of General Microbiology* 101, 35–40.

- Pleadin, J., Vulic, A., Persi, N., Skrivanko, M., Capek, B. & Cvetnic, Z. (2015). Annual and regional variations of aflatoxin B1 levels seen in grains and feed coming from Croatian dairy farms over a 5-year period. *Food Control*, 47:221–225.
- Pleadin, J., Vulić, A., Perši, N., Škrivanko, M., Capek, B. & Cvetnić, Ž. (2014). Aflatoxin B1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. *Food Control*. 40:286–291.
- Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., and Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology* 47:984–991.
- Prencipe S., Siciliano I., Contesa C., Botta R., Garibaldi A., Gullino M.L., Sparado D. (2018). Characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from fresh chestnuts and along chestnuts flour process. *Food Microbiol.* 69: 159-169.
- Probst C., Bandyopadhyay R., Cotty P.J. (2014). Biodiversity of aflatoxin-producing fungi and their impact on food safety in sub-saharian Africa. *Int. J. Food Microbiol.* 174: 113-122.
- Probst, C., Schulthess, F., Cotty, P.J. (2010). Impact of *Aspergillus* section *Flavi* community structure on the development of lethal levels of aflatoxins in Kenyan maize (*Zea mays*). *J. Appl. Microbiol.* 108: 600–610
- Probst, C., Njapau, H., and Cotty, P.J. (2007). Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent. *Applied and Environmental Microbiology* 73:2762–2764.
- Ra, D., and Ma, G. (1996). Immunosuppressant activity of aflatoxin ingestion in rabbits measured by response to *Mycobacterium bovis* antigen I. Cell mediated immune response measured by skin test reaction. *Veterinary and Human Toxicology* 38:333-336
- Ramagnoli, B., Menna, V., Gruppioni, N., and Bergamini, C. (2007). Aflatoxins in spices, aromatic herbs, herb-teas and medicinal plants marketed in Italy. *Food Control* 18: 697- 701.
- Ramirez-Prado, J. H., Moore, G. G., Horn, B. W., and Carbone, I. (2008). Characterization and population analysis of the mating-type genes in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genet. Biol.* 45:1292–1299. doi: 10.1016/j.fgb.2008.06.007
- Rank, C., Nielsen, K.F., Larsen, T.O., Varga, J., Samson, R.A., and Frisvad, J.C. (2011). Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biology* 115:406–420.
- Rao, B. L., & Husain, A. (1985). Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing 'kodu poisoning' in man and its production by associated fungi. *Mycopathologia*, 89:177–180.
- Raper K., Fennell D.J. (1965). *The genus Aspergillus*, Williams and Wilkins editors, Baltimore

Reddy, K. R. N., Farhana, R. I., and Salleh, B. (2011). Occurrence of *Aspergillus* spp. and aflatoxin B1 in Malaysian foods used for human consumption. *J. Food Sci.* 76: 99-104.

Reddy, S. V., Mayi, D. K., Reddy, M. U., Thirumala-Devi, K., and Reddy, D. V. (2001). Aflatoxins B1 in different grades of chillies (*Capsicum annum* L.) in India as determined by indirect competitive-ELISA. *Food Addit. Contam.* 18: 553-558.

Reiss E., Tanaka K., Bruker G., Chazalet V., Coleman D., Debeauvais 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. et Yamaguchi H. (1998). Molecular Diagnosis and Epidemiology of Fungal Infections. 36:249–257.

Rezaei M, Karimi F, Parviz M, Behzadi AA, Javadzadeh M, Mohammadpourfard I. (2014). An empirical study on aflatoxin occurrence in nuts consumed in tehran, iran 2013. 6:649–53. doi: 10.4236/health.2014.68084.

Riba, A., Bouras, N., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A., and Sabaou, N. (2010). *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food and Chemical Toxicology* 48:2772–2777.

Richard, E., Heutte, N., Bouchart, V., & Garon, D. (2009). Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Animal Feed Science and Technology*, 148(2-4), 309-320.

Rodrigues P, Venancio A, Lima N. (2012). Aflatoxigenic fungi and aflatoxins in Portuguese almonds. *SciWorld J.* 1–9

Rodrigues, I. & Naehrer, K. (2012). A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. *Toxins.* 4:663–75.

S.W. Peterson, Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis, In: R.A. Samson, J.I. Pitt (Eds.), *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 323–355.

Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraken, J., Hong, S.B., Hubka, V., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Susca, A., Tanney, J.B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., Frisvad, J.C. (2014). Taxonomy identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 78:141–173

Samson, R. A., & Varga, J. (Eds.). (2010). *An overview of the genus Aspergillus*. Wymondham, Norfolk, UK: Caister Academic.

Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C., Andersen, B. (2010). *Food and indoor Fungi*. CBS Laboratory Manual Series, CBS Knaw, Fungal biodiversity center, Utrecht, Netherland, 390 p.

Samson R.A., Hong S.B. et Frisvad J.C. (2006). Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology.* 44:133–148.

- Sangare-Tigori B, Moukha S, Kouadio HJ, Betbeder AM, Dano DS, Creppy EE. (2006). Co-occurrence of aflatoxin B₁, fumonisin B₁, ochratoxin A and zearalenone in cereals and peanuts from Côte d'Ivoire. *Food Addit Contam.* 10:1000–1007.
- Santos, L., Marín, S., Sanchis, V., and Ramos, A. J. (2010). Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Capsicum powder samples available on the Spanish market. *Food Chem.* 122:826-830.
- Sauer, D.B. (1978). Contamination by mycotoxins: when it occurs and how to prevent it. in : Wyllie, T.D. & Morehouse, I.D., eds, *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, mycotoxicoses of man and plants-an. Encyclopedic Handbook, vol 3 mycotoxin control and regulatory practices*, Marcel Dekker, New York, 147-158
- Schmidt-Heydt, M., Abdel-Hadi, A., Magan, N., and Geisen, R. (2009). Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *International Journal of Food Microbiology* 135:231–237
- Sétamou, M., Cardwell, K.F., Schulthess, F. & Hell, K. (1997). Infection and Aflatoxin Contamination of Preharvest Maize in Benin. *Plant Disease.* 81:1323–1327.
- Shotwell O.L., Burg W.R., Dille T. (1981). Thin layer chromatographic determination of aflatoxin in corn dust. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64:1060-1063.
- Shundo, L., De Almeida, A. P., Alaburda, J., Lamardo, L. C. A., Navas, S. A., Ruvieri, V., and Sabino, M. (2009). Aflatoxins and ochratoxin A in Brazilian paprika. *Food Control* 20: 1099-1102.
- Siahi Shadbad MR, Ansarin M, Tahavori A, Ghaderi F, Nemati M. (2012). Determination of aflatoxins in nuts of Tabriz confectionaries by ELISA and HPLC methods. *Adv Pharm Bull.* 2(1):123–6. doi: 10.5681/apb.2012.018. [PubMed: 24312781].
- Sinha, A.K. & Sinha, K.K. (1990). Insect Pests, *Aspergillus-Flavus* and Aflatoxin Contamination in Stored Wheat - a Survey at North Bihar (India). *Journal of Stored Products Research.* 26:223–226. Sinha, K.K. & Bhatnagar, D. (1998). *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety* CRC Press.
- Sinha, K.K. & Sinha, A.K. (1991). Effect of *Sitophilus oryzae* infestation on *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination in stored wheat. *Journal of Stored Products Research,* 27, 65–68.
- Soares C., Rodrigues P., Peterson S.W., Lima N., Venancio A. (2012). Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. *Mycologia.* 104:682–697.
- Soares, C., Rodrigues, P., Peterson, S.W., Lima, N., and Venancio, A. (2011). Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. *Mycologia.* 104:682–697.

Stoloff, L., Verrett, M.J., Dantzman, J., and Reynaldo, E.F. (1972). Toxicological study of aflatoxin P1 using the fertile chicken egg. *Toxicology and Applied Pharmacology* 23:528–531.

Streit, E., Naehrer, K., Rodrigues, I. & Schatzmayr, G. (2013a). Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: Long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93:2892–2899.

Streit, E., Schwab, C., Sulyok, M., Naehrer, K., Krska, R. & Schatzmayr, G. (2013b). Multi-mycotoxin screening reveals the occurrence of 139 different secondary metabolites in feed and feed ingredients. *Toxins*. 5:504– 23.

Strohl, W. R. (1997). Industrial antibiotics: today and the future. In WR (ed). *Bio/technology of antibiotics*, 2nd edn. Marcel Dekker. New York. 1-47.

Sung C.T., Chang S.L., Entwistle R., Ahn G., Lin T.S., Petrova V., Yeh H.H., Praseuth M.B., Chiang Y.M., Oakley B.R., Wang C.C. (2017). Overexpression of a three-gene conidial pigment biosynthetic pathway in *Aspergillus nidulans* reveals the first known to acetylate tryptophan. *Fung. Genet. Biol.* 101:1-6.

Sutton D.A., Fothergill A.W., Rinaldi M.G. (1998). *Guide to clinically significant fungi*, Baltimore, Williams and Willkins

Tabuc, C., Taranu, I., and Calin, L. (2011). Survey of moulds and mycotoxin contamination of cereals in South- Eastern Romania in 2008-2010. *Archiva Zootechnica*. 14:25–38.

Taniwaki, M. H., & Pitt, J. I. (2013). Mycotoxins. In M. P. Doyle, & R. L. Buchanan (Eds.), *Food microbiology: Fundamentals and frontiers* (pp. 597–618) (4th ed.). Washington, D.C.: ASM Press.

Taniwaki M.H., Pitt J.I., Iamanaka B.T., Sartori D., Copetti M.V., Balajee A., Fungaro M.H., Frisvad J.C., 2012. *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil nuts. *PLoS One* 7:e42480

Taniwaki M.H., Hocking A.D., Pitt J.I. et Fleet G.H. (2001).- Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 125–133.

Theumer, M.G., López, A.G., Masih, D.T., Chulze, S.N., and Rubinstein, H.R. (2003). Immunobiological effects of AFB1 and AFB1–FB1 mixture in experimental subchronic mycotoxicoses in rats. *Toxicology* 186, 159–170.

Uka V., Moore G.G., Arroyo-Manzanares N., Nebija D., De Saeger S., Diana Di Mavungu J., 2017. Unravelling the diversity of the cyclopiazonic acid family of mycotoxins in *Aspergillus flavus* by UHPLC triple-TOF HRMS. *Toxins* 9, pii E35, doi: 10.3390/toxins9010035

- Vaamonde G., Patriarca A., Fernandez Pinto V., Comerio R., Degrossi C. (2003). Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 79-84.
- Vainio H., Magee P., McGregor D., McMichael A. (1992). *Mechanisms of Carcinogens in Risk Identification*, IARC Scientific Publications No 116, IARC, Lyon.
- Valiante V., Baldin C., Hortschansky P., Jain R., Thywissen A., Strassburger M., Shelest E., Heinekamp T., Brakhage A.A., 2016. The *Aspergillus fumigatus* conidial melanin production is regulated by the bifunctional bHLH DevR and MADS-box RlmA transcription factors. *Mol. Microbiol.* 102, 321-335.
- Varga, J., Frisvad, J. C., and Samson, R. A. (2011). Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Stud. Mycol.* 69, 57–80. doi: 10.3114/sim.2011.69.05
- Vesely D., Vesela D., Jelinek R. (1983) Comparative assessment of the aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ and M₁ embryotoxicity in the chick embryo. *Toxicol. Letters*, 1983, 15, 297-302.
- Viaro, H.P., Silva, J.J., Ferranti, L.S., Bordini, J.G., Massi, F.P., Fungaro, M.H.P., 2017. The first report of *A. novoparasiticus*, *A. arachidicola* and *A. pseudocaelatus* in Brazilian corn kernels. *Int. J. Food Microbiol.* 243, 46–51.
- Villa, P., and Markaki, P. (2009). Aflatoxin B₁ and ochratoxin A in breakfast cereals from Athens market: Occurrence and risk assessment. *Food Control* 20, 455–461.
- Walid Hammami, Stefano Fiori, Roda Al Thani, Najet Ali Kali, Virgilio Balmas, Quirico Migheli, Samir Jaoua (2014). Fungal and aflatoxin contamination of marketed spices. *Food Control* 37 (2014) 177-181
- Wang H., Ng T.B., 2005. An antifungal protein from ginger rhizomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 336, 100-104.
- Weidenböner, M., Wiczorek, C., Appel, S. and Kunz, B. (2000). Whole wheat and white wheat flour. The mycobiota and potential mycotoxins. *Food Microbiology* 17: 103-107
- Weidenböner M. (1998) - *Lebensmittel-Mykologie* B. Behr's Verlag GmbH und Co.1 ISBN 3- 86022-457-3.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315-322). San Diego, CA: Academic Press
- Widiastuti R., Maryam R., Blaney B.J., Stoltz S., Stoltz D.R., 1988. Cyclopiazonic acid in combination with aflatoxin zearalenone and ochratoxin A in Indonesian corn. *Mycopathologia* 104, 153-156.

Wild, C.P., and Gong, Y.Y. (2010). Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Oxford journals life science and medicine, Carcinogenesis* 31, 71–82.

Wild, C.P., Hall, A.J., Howard, D.H., and Miller, J.D. (1996). Epidemiology of mycotoxin related disease. 213– 227.

Xianwen Lai, He Zhang, Ruicen Liu, Chenglan Liu *Saudi Journal of biological sciences* (2015). Potential for aflatoxin B1 and B2 production by *Aspergillus flavus* strains isolated from rice samples, 22, 176-180

Yiannikouris, A. et Jouany, J.P. (2002). - Mycotoxins in feeds and their fate in animals, a review. *Animal Research*, 51, 81–99.

Yu, J., and Ehrlich, K.C. (2011). Aflatoxin biosynthetic pathway and pathway genes. *Intech* 41 66.

Yu, J. & Keller, N. (2005) Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 437–458.

Yu, J., Whitelaw, C.A., Nierman, W.C., Bhatnagar, D. & Cleveland, T.E. (2004) *Aspergillus flavus* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in aflatoxin contamination of crops. *FEMS Microbiology Letters*, 237, 333–40.

Zacchino S.A., Butassi E., Liberto M.D., Raimondi M., Postigo A., Sortino M., 2017. Plant phenolic and terpenoids as adjuvants of antibacterial and antifungal drugs. *Phytomedicine* 37, 27-48.

Zaied, C., Abid, S., Bouaziz, C., Chouchane, S., Jomaa, M., and Bacha, H. (2010). Ochratoxin A levels in spices and dried nuts consumed in Tunisia. *Food Addit. Contam. Part B* 3: 52-57.

Zhao Y, Huang J, Ma L, Liu S, Wang F. 2017. Aflatoxin B1 and sterigmatocystin survey in beer sold in China. *Food Addit Contam.* 10:64–68.

Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debegnach, F., Angelini, S., De Santis, B., Faid, M., Benlemlih, M., Minardi, V., and Miraglia, M. (2006). Natural occurrence of mycotoxins in cereals and species commercialized in Morocco. *Food Control* 17: 868-874