



HAL
open science

Maîtrise du risque aflatoxique : utilisation d'extraits naturels et mise en évidence de leurs mécanismes d'action

Rhoda El Khoury

► **To cite this version:**

Rhoda El Khoury. Maîtrise du risque aflatoxique : utilisation d'extraits naturels et mise en évidence de leurs mécanismes d'action. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2016. Français. NNT : 2016INPT0058 . tel-04247573

HAL Id: tel-04247573

<https://theses.hal.science/tel-04247573>

Submitted on 18 Oct 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 (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme RHODA EL KHOURY

le jeudi 7 juillet 2016

Titre :

MAITRISE DU RISQUE AFLATOXIQUE: UTILISATION D'EXTRAITS
NATURELS ET MISE EN EVIDENCE DE LEURS MECANISMES
D'ACTION

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Toxicologie Alimentaire (ToxAlim)

Directeur(s) de Thèse :

M. JEAN-DENIS BAILLY

M. ANDRE EL KHOURY

Rapporteurs :

M. JEROME MOUNIER, UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

M. KAZEM ZIBARA, UNIVERSITE LIBANAISE BEYROUTH

Membre(s) du jury :

Mme ISABELLE OSWALD, INRA TOULOUSE, Président

M. ALI ATAOU, UNIVERSITE LIBANAISE BEYROUTH, Membre

M. ANDRE EL KHOURY, UNIVERSITE ST JOSEPH DE BEYROUTH, Membre

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

*Tout revient à Celui qui m'a créée, façonnée et donné bien
plus que je ne mérite...*

À vous, Maman, Papa, Rawad et Rachelle

Remerciements

La thèse pour moi était un voyage particulièrement riche, tant au niveau professionnel que personnel. Ce mémoire est le point culminant de plus de trois années et n'aurait pas vu la lumière sans le soutien et la présence de nombreuses personnes que je tiens à remercier par ces mots. Merci à tous ceux que j'ai oubliés, qu'ils m'en excusent.

Ces travaux ont été accomplis à l'UMR1331 Toxalim, INRA de Toulouse et la Faculté des Sciences de l'USJ grâce aux financements assurés par l'Agence Nationale de la Recherche, Campus France et le Conseil de Recherche de l'Université Saint-Joseph.

*J'adresse mes remerciements aux membres du jury et aux rapporteurs **Mr. Jérôme Mounier** et **Mr. Kazem Zibara** qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail.*

*Je remercie vivement la présidente du jury, **Mme Isabelle Oswald**, qui m'a accueillie au sein de l'équipe Biosynthèse et Toxicité des mycotoxines, et surtout pour son œil avisé et ses conseils qui sont toujours pertinents à l'amélioration de l'ensemble des travaux de l'équipe.*

*Je remercie **Mr. Bernard Salles**, directeur de l'UMR 1331 Toxalim de l'INRA de Toulouse de m'avoir permis de conduire mes travaux de thèse dans ce laboratoire.*

*Je tiens également à remercier le Vice-Recteur de l'Université Saint-Joseph **Mr. Toufic Rizk** d'avoir toujours encouragé la recherche au sein de notre faculté et le Doyen de la Faculté des Sciences **Mr. Richard Maroun** pour sa bienveillance, son esprit compréhensif et ses qualités gestionnaires et scientifiques que j'ai toujours admirées en tant qu'étudiante à l'USJ.*

*Je souhaite exprimer mes remerciements à mes deux directeurs de thèse. Je suis plus que reconnaissante à **Mr. Jean-Denis Bailly** pour votre incommensurable dévouement et votre bonne humeur permanente. Votre soutien était mon moteur dès le début et surtout durant cette dernière ligne droite. On a touché au but ! J'ai beaucoup appris de votre méthodologie de travail et de vos capacités scientifiques et analytiques qui sont exemplaires. Merci pour tout le temps que vous avez pris pour relire et améliorer ce manuscrit et notamment mon style « fleuri ». Je vous remercie également pour votre franchise, d'avoir été toujours disponible et pour votre calme à gérer toute situation. Je souhaite à tout thésard d'avoir un directeur qui a vos qualités scientifiques et aussi humaines. Un grand merci à **Mr. André El Khoury** pour la confiance qu'il m'a accordée dès le début et jusqu'à la fin de mon parcours académique. Merci d'avoir cherché à faciliter mes séjours au Liban et en France ainsi que toute démarche administrative, même à distance. Merci d'être toujours à l'écoute, pour la porte du bureau qui est toujours ouverte, tes mots*

d'encouragements et ton esprit compréhensif. Toulouse n'aurait pas été dans mes plans sans ton intervention ; ce voyage et cette thèse te doivent beaucoup...

*J'ai eu un grand plaisir d'échanger avec mes deux encadrant de thèse. Mes mots restent modestes pour exprimer toute ma gratitude à **Mr. Olivier Puel** qui m'a pris sous ses ailes durant mes travaux de Master 2 et de thèse. Ta passion à la recherche est contagieuse, merci pour toutes les discussions scientifiques et les connaissances/compétences que tu as partagées avec moi. Je reste très sensible à la confiance que tu m'as accordée et tes conseils tout au long de ce parcours. Je remercie aussi vivement **Mr. Ali Atoui** pour ses conseils, ses idées pertinentes et tout l'échange scientifique que l'on a eu. Merci de m'avoir toujours encouragée et cru en mes capacités.*

*Mes remerciements les plus sincères à tous les membres de l'équipe 5 de Toxalim, Biosynthèse et Toxicité des Mycotoxines et particulièrement : **Sylviane**, ça a commencé par un petit moulin à poivre et ça c'est clôturé par des cachets de Mg B6. J'ai beaucoup appris de tes compétences en mycologie et de ta méthodologie. Merci pour ton œil critique, tes conseils et pour tous les moments passés à discuter de sciences ou autres choses aussi intéressantes ! Ma **Soraya**, je n'oublierais jamais ton accueil chaleureux mon premier jour à Toxalim et je te remercie pour ta bienveillance sur moi. **Joëlle**, ton sourire, ta réactivité et ton efficacité pour les commandes sont exemplaires, merci **Philippe** pour ton silence qui veut tout dire parfois. **Arlette**, tu es une épaule de confort, merci pour ton aide dans les cultures et les nombreuses tâches au labo qui nous facilitent le travail. Merci pour le sourire qui ne quitte pas ton visage même quand tu es fatiguée. Je remercie également **Marie-Rose** pour son aide au tout début à faire le rangement et la vaisselle et pour ses visites occasionnelles après la retraite.*

*Je tiens à remercier mes amies, sans lesquelles ce parcours n'aurait pas été pareil. Une amitié inattendue mais qui s'est prouvée solide, merci **Joanna** pour ta présence à mes côtés, ton esprit toujours optimiste et pour toutes les aventures qu'on a vécu ensemble. Une personne extraordinaire et certes unique, merci **Selma** pour l'énergie contagieuse que tu dégages, les cafés à 7h45, les déplacements à l'aéroport, les discussions pâtisseries... Pour vous deux, 4 ans nous ont permis de cultiver une amitié beaucoup plus virulente que notre fameux Patulin Team ! J'ai eu l'honneur de travailler avec vous. **Christelle**, plus de 8 ans déjà ! Merci d'être toujours la personne qui me dira la vérité quoique ça coûte. J'apprécie énormément ton honnêteté et ton soutien au fil des années. We're doing it ! Mon amie sur tous les réseaux académiques, techniques et sociaux imaginables, **Isaura**, j'ai eu un grand plaisir et beaucoup de rires à travailler avec toi. Bon courage et bonne chance pour la suite, this is SPARTAAA !*

*Je remercie mes collègues sans lesquels ce parcours aurait été certes moins agréable : mes deux super collègues de bureau **Alix** et **Delphine** ; **Joya**, **Brankica** et **Amaranta** pour tous les moments qu'on a*

*passés ensemble ; **Laura, Immourana, Antoine, Anwar, Patricia, Julie, Pascal, Sabria, Leticia, Viviane, Duncan, Sophal, Yann, Agathe, Sophie, Joanne et Tala.** Je pense également aux doctorantes ou déjà-docteurs à l'USJ que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant mes études et mes courts séjours au Liban, **Noëlle, Rachelle, Joëlle, Hiba et Mandy.** Je vous souhaite tout le bonheur et la réussite que vous méritez.*

*Merci aux membres et chercheurs de Toxalim qui ont contribué de loin ou de proche à mes travaux et mon installation : **Nicolas** pour tes conseils apprêtés dans les étapes de purification par HPLC mais surtout de t'être occupé de la précieuse machine à café et de l'alimentation du stock de graines ! **Yannick** pour ton aide au plateau TRIX et tes conseils en Statistiques ; **Claire**, merci de t'être pliée à nos changements de créneaux, nos manip urgentes et de t'en être soucieuse de résoudre nos problèmes ; **Sarah** et **Joelle** d'avoir gentiment géré mes démarches administratives, **Jeannette** pour les discussions autour du café matinal, **Vincent** pour ton aide cruciale en informatique.*

*Je n'oublie pas mes professeurs à l'USJ qui m'ont tant influencée et soutenue. **Mme Mireille Kallassy, Mr. Joseph Yaghi et Mr. Roger Lteif**, je vous remercie sincèrement pour votre soutien, vos conseils et votre attention envers moi. Je remercie également **Mr Charbel Afif**, pour ses conseils et son aide dans mes premières analyses d'HPLC.*

*Je tiens à remercier des personnes merveilleuses qui sont plus qu'amies. Ma petite famille Toulousaine **Dasha, Malia, Noémie et Agnès.** My girls du Liban, **Nahy, Krystal, Ruth, Joanna, Rania** et le reste des Sheilas !*

À ma famille qui m'a toujours accompagnée de cœur, je vous dois beaucoup...

***Papa**, tu as toujours travaillé et veillé à ce qu'on ait les meilleures opportunités. Merci pour tes sacrifices et ton soutien au fil des années: je te serais reconnaissante à vie. I'm blessed being the daughter of a woman of great faith, strength, compassion and intelligence. **Mum**, sickness and hardships were never a good excuse; you bit on your wound, fought on your knees and didn't think twice before going to extremes for the people you care about. Thank you for your love and prayers; I hope you're proud of your girl. Au frangin et à la frangine, **Rawad et Rachelle**, mes deux meilleurs amis, mon soutien, my people, les personnes qui connaissent mes délires, folies, joies, et pleurs ; je ne saurais vous exprimer à quel point je vous aime...*

Liste des Figures

Figure 1. Les différentes voies métaboliques des mycotoxines.....	9
Figure 2. Structure des 5 principales aflatoxines.....	15
Figure 3. Différents niveaux physiologiques de la toxicité de l'AFB1.....	17
Figure 4. Cycle infectieux d' <i>A. flavus</i> , saprophyte du sol, sur des cultures de maïs.....	21
Figure 5. Structure typique d'un <i>Aspergillus</i>	28
Figure 6. Culture d' <i>A. flavus</i> sur milieu Malt Extract Agar.....	29
Figure 7. Culture d' <i>A. parasiticus</i> sur milieu Malt Extract Agar.....	30
Figure 8. Disposition des 30 gènes du cluster responsable de la biosynthèse des aflatoxines chez <i>A. flavus</i>	36
Figure 9. Cascade enzymatique conduisant à la synthèse des aflatoxines B1, B2, G1 et G2 et représentation des gènes du cluster codant les enzymes intervenant dans chacune des conversions.....	37
Figure 10. Formation de l'acide norsolorinique (NOR), premier précurseur stable des aflatoxines à partir de la condensation de groupements acétyl- et malonyl-CoA.....	39
Figure 11. Schéma hypothétique de l'interaction entre AflR et AflS pour l'activation du cluster des aflatoxines.....	45
Figure 12. Schéma hypothétique simplifiant les interactions entre différentes familles de facteurs régulateurs d'AflR et AflS.....	47
Figure 13. Modèle de l'activation transcriptionnelle des gènes dits « antioxydants » et des gènes de la voie de biosynthèse par différents facteurs de transcription en réponse au stress oxydatif.....	53
Figure 14. Réaction d'ammoniation de l'aflatoxine B1.....	70
Figure 15. Diagramme représentant les modes d'action cellulaires hypothétiques des huiles essentielles.....	77
Figure 16. Pourcentages d'inhibition de production des 4 aflatoxines de différentes souches d' <i>Aspergillus</i> de la section <i>Flavi</i> sur un milieu MEA supplémenté par de l'hysope.....	147
Figure 17. Comparaison des ratios d'expression des gènes modulés chez <i>A. flavus</i> E73, sensible à l'inhibition par l'extrait aqueux, et <i>A. parasiticus</i> NCPT211, résistant à cet effet.....	148
Figure 18. Altérations morphologiques observées chez les souches d' <i>A. flavus</i>	150
Figure 19. Altérations morphologiques observées chez la souche sensible d' <i>A. parasiticus</i> NCPT262.....	150
Figure 20. Altérations morphologiques observées chez la souche résistante d' <i>A. parasiticus</i> NCPT211.....	151

Liste des Tableaux

Tableau 1. Principales mycotoxines faisant l'objet de seuils réglementaires, principales moisissures productrices associées, denrées fréquemment contaminées et effets toxiques majeurs	13
Tableau 2. Valeurs réglementaires en vigueur en UE pour les aflatoxines dans l'alimentation humaine et animale (μg d'AF par kg de matrice alimentaire) selon la Directive 2002/32/EC du 7 Mai 2002 et le Commission (EC) No 1881/2006 du 19 Décembre 2006.....	20
Tableau 3. Occurrence de l'AFB1 dans le maïs et les denrées alimentaires à base de maïs en Europe, Asie de l'Est et Afrique depuis 2013	25
Tableau 4 Occurrence d'AFM1 dans différents types de lait ou produits laitiers en Europe, Asie de l'Est, Moyen Orient et Afrique depuis 2012.....	26
Tableau 5. Liste des 20 espèces aflatoxinogènes appartenant aux sections <i>Flavi</i> , <i>Ochraceo-rosei</i> et <i>Nidulantes</i>	31
Tableau 6. Influence des différents facteurs environnementaux sur la production d'AF/ST et l'expression d' <i>aflR</i> chez <i>A. nidulans</i> , <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i>	48
Tableau 7. Méthodes de détoxification physico-chimiques des aflatoxines : conditions adoptées, denrées utilisées et efficacité du traitement	69
Tableau 8. Efficacité d'adsorbants inorganiques à lier l'AFB1 dans des modèles <i>in vitro</i> du système gastro-intestinal.....	72
Tableau 9. Effet inhibiteur de quelques huiles essentielles sur la croissance d' <i>A. flavus</i> et la production d'AFB1	75
Tableau 10. Effet de 4 composés actifs majeurs des HE sur la croissance d' <i>A. flavus</i> PTCC 5004 et la production de l'aflatoxine B1 sur milieu SDA après 7 jours d'incubation à 35°C.....	76
Tableau 11. Concentrations minimales fongicides (MFC) de la croissance d' <i>A. flavus</i> 48h (25°C) après culture sur un milieu PDA supplémenté par des extraits aqueux de plantes médicinales.	80

Liste des Abréviations

AC	Protéine transporteur d'acyle
ACP	Acide cyclopiazonique
ADN	Acide desoxyribonucléique
AF	Aflatoxine
AFB	Aflatoxines type B
AFB1	Aflatoxine B1
AFB2	Aflatoxine B2
AFG	Aflatoxines type G
AFG1	Aflatoxine G1
AFG2	Aflatoxine G2
AFM1	Aflatoxine M1
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ALARA	As Low As Reasonably Possible
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AT	Acyl transférase
AVF	Avérufine
AVN	Avérintine
AVNN	Avérufanine
Aw	Activité de l'eau
CAST	Council for Agricultural Science and Technology
CAT	Catalases
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
DHDMST	Dihydrométhylstérigmatocystine
DHOMST	Dihydro-O-méthylstérigmatocystine
DHST	Dihydrostérigmatocystine
DMATS	Diméthylallyl Tryptophane Synthase
DMST	Diméthylstérigmatocystine

DON	Deoxynévalénol
EC	European Union
EPA	Agence de Protection Environnementale
EST	Expressed Sequence Tags
EU	European Commission
FAO	Food and Agriculture Organisation
FB1	Fumonisine B
FDA	Food and Drug Administration
FT	Facteur de Transcription
FUM	Fumonisine
GC/MS	Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
GIT	Gastro-Intestinal
HACCP	Hazard Analysis of Critical Control Points
HAVN	5'Hydroxy-avérintine
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HCSAS	Na-Ca-aluminosilicate hydraté
HE	Huile Essentielle
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HVN	Hydroxy-versicolorone
ITTA	Institut International d'Agriculture Tropicale
JEFCA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
KS	Kétosynthase
LAB	Bactéries lactiques
MAT	Malonyl-CoA : AC transacyclase
MEA	Malt Extract Agar
MFC	Minimum Fungicidal Concentration
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
NOR	Acide norsolorinique
NRPS	Non Ribosomal Peptide Synthase
OAVN	Oxo-avérintine
OMST	O-méthylstérigmatocystine
OTA	Ochratoxine A

PAT	Patuline
PDA	Potato Dextrose Agar
PKS	Polykétide Synthase
ppb	Particules par billion
qPCR	Réactions de polymérisation en chaînes quantitatives
ROS	Espèces réactives de l'Oxygène
rpm	Rotations par minute
RT	Reverse Transcriptase
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
siARN	ARN silencing
SOD	Superoxyde dismutase
ST	Stérigmatocystine
STRE	Stress Response Element
TC	Terpènes cycliques
TE/CLC	Thioesterase/Claisen-like cyclase
VCG	Groupe de Compatibilité Végétative
VER A	Versicolorine A
VER B	Versicolorine B
VHA	Versiconal Hemiacétal Acétate
VHOH	Versional
WHO	World Health Organization
ZEN	Zéaralénone

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
CONTEXTE DE L'ETUDE	3
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE: AFLATOXINES	7 A.
Les mycotoxines: des contaminants fréquents des aliments	8
A.1. Étymologie et définition	8
A.2. Conditions de synthèse.....	10
A.3. Prévalence des mycotoxines et contamination alimentaire.....	10
A.4. Impact sur les hommes et les animaux	12
B. Généralités sur les aflatoxines	14
B.1. Caractéristiques biochimiques	14
B.2. Toxicité	15
B.3. Règlementations.....	19
C. Contamination des aliments et impact mondial	21
C.1. Denrées contaminées.....	21
C.2. Distribution géographique et exposition aux aflatoxines	22
C.3. Importance économique	27
D. Conditions de production, voie de biosynthèse et régulation	27
D.1. Les espèces productrices d'aflatoxines	27
D.2. Conditions de développement et d'aflatoxinogénèse	32
D.3. Voie de biosynthèse des aflatoxines.....	36
D.4. Régulation du cluster des aflatoxines	42
E. Moyens de lutte contre les aflatoxines	54
E.1. Les bonnes pratiques agricoles.....	54
E.2. Les pesticides.....	57
E.3. Utilisation du génie génétique pour créer des cultures résistantes.....	61
E.4. Les stratégies de bio-contrôle	63
E.5. Détoxification physico-chimique.....	68
E.6. Adsorption	71

F. Les extraits naturels de plantes : une stratégie alternative de lutte contre la contamination par les aflatoxines -----	73
F.1. Les huiles essentielles -----	74
F.2. Les extraits aqueux de plantes médicinales-----	80
TRAVAIL EXPERIMENTAL -----	81
Chapitre 1- Développement et validation d'un outil d'étude du mécanisme d'action moléculaire de composés anti-aflatoxinogènes -----	85
A. Introduction	
B. Article publié: Deciphering the anti-aflatoxinogenic properties of eugenol using a large-scale qPCR approach-----	88
C. Conclusion -----	105
Chapitre 2 – Test d'efficacité d'extraits de plantes : Comparaison de l'effet anti-aflatoxine d'huiles essentielles et d'extraits aqueux -----	107
A. Introduction-----	109
B. Article en préparation: Screening the anti-aflatoxinogenic activity of aqueous plant extracts in comparison to their essential oils -----	110
C. Conclusion -----	121
Chapitre 3 – Caractérisation de l'effet d'un extrait aqueux d'hysope – <i>Micromeria graeca</i>, sur la synthèse de l'aflatoxine B1 -----	123
A. Introduction-----	123
B. Article soumis (<i>Journal of Natural Products</i>): Identification of a new anti-aflatoxinogenic aqueous extract from <i>Micromeria graeca</i> and elucidation of its molecular mechanism in <i>Aspergillus flavus</i> -----	127
C. Données supplémentaires à l'étude -----	127
D. Conclusion-----	151
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES -----	156
RÉFÉRENCES -----	162

« La sécurité des aliments existe quand tous les hommes, à tout temps, ont un accès physique et économique à une alimentation suffisante, sécurisée et nutritive qui pourvoit à leurs besoins diététiques et leurs préférences alimentaires pour une vie active et saine. »

FAO, 1996 - Déclaration du « World Food Summit » à Rome

Introduction



CONTEXTE DE L'ETUDE

Les champignons filamenteux possèdent une capacité remarquable à se développer sur des substrats variés et relativement simples dont ils arrivent à utiliser les éléments constitutifs comme nutriments. Au cours de leur développement, ils produisent aussi des métabolites secondaires. Le métabolisme secondaire fongique est très complexe et produit de nombreux composés de natures très différentes. Ces molécules sont synthétisées en réponse à différents types de signaux environnementaux (abiotiques et biotiques) et peuvent conférer à leurs producteurs des avantages compétitifs. Les champignons sont des « micro-usines » biologiques qui peuvent être mises à profit pour la production de composés d'intérêt pharmaceutique (antibiotiques, suppresseurs de tumeurs et immunosuppresseurs) et industriel (antioxydants, pigments, acides organiques, etc). Cependant, ils peuvent aussi produire un certain nombre de métabolites toxiques, nommées mycotoxines, qui sont dangereux pour l'homme et l'animal. Leur présence dans les denrées alimentaires est réglementée et ces mycotoxines sont responsables de pertes économiques principalement liées au déclassement des lots identifiés contaminés.

La découverte de ces composés a souvent été associée à des accidents toxiques aigus, survenus généralement chez les animaux. Ainsi, en Angleterre, au début des années 1960, la « Turkey « X » disease » à l'origine de la mort de plusieurs dizaines de milliers de volailles a permis la découverte des aflatoxines à partir des aliments distribués aux animaux (Richard 2008).

Depuis cette période, les aflatoxines sont parmi les mycotoxines les plus étudiées et les plus strictement réglementées. Cette importance est essentiellement due à leur impact sanitaire et économique. En effet, l'aflatoxine B1 (AFB1) est le cancérigène naturel le plus puissant connu à l'heure actuelle et elle est directement impliquée dans l'apparition de cancer du foie (HCC) chez l'homme et d'autres pathologies hépatiques (jaunisse, nécrose, cirrhose, hépatites) ou non (immuno-suppression, troubles de la croissance...). L'AFB1 est classée par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) dans le groupe 1 qui

regroupe les molécules cancérigènes pour l'homme et l'animal. L'impact sanitaire de ce composé a justifié la mise en place de mesure de protection des consommateurs par l'établissement de normes maximales tolérables dans certaines catégories d'aliments. Cependant, l'existence de ces normes a aussi des répercussions économiques importantes en limitant les échanges commerciaux en provenance de certaines zones où la contamination est fréquente et en diminuant fortement la valeur économique de certaines productions en cas de contamination. Ces pertes sont estimées par la FAO (« Food and Agriculture Organization » des Nations Unis) à environ 1 milliard de tonnes par an.

Il semble donc impératif de développer des moyens de lutte pour prévenir la contamination des aliments par ces composés toxiques et/ou d'en limiter les effets néfastes. Les pesticides et les fongicides ont été largement utilisés pour empêcher le développement des agents fongiques. Cependant, à cause de leur toxicité propre, leur utilisation est de nos jours soumise à certaines restrictions. La lutte biologique représente aussi une option possible de lutte. Ainsi des souches bactériennes et fongiques atoxinogènes se sont avérées efficaces pour réduire le développement de souches toxiques d'*A. flavus*. De même, des procédés de détoxification peuvent être mis en place pour essayer de réduire la toxicité de ces toxines après leur synthèse. Cependant, aucune de ces stratégies ne semble, à elle seule, capable de régler le problème de la contamination des matières premières par les aflatoxines comme en attestent les nombreuses enquêtes qui montrent des niveaux de contamination parfois élevés, en particulier dans les régions où le climat est favorable au développement des espèces fongiques productrices de ces composés.

A l'heure actuelle, on note un intérêt croissant pour identifier des composés naturels capables de limiter la croissance et/ou la production des mycotoxines. Ainsi, l'utilisation des extraits ou des huiles essentielles de plantes ou d'épices a pu montrer leur capacité à limiter la contamination des aliments.

Afin de caractériser le potentiel inhibiteur d'une substance anti-aflatoxinogène et de développer des stratégies de lutte ciblées contre l'AFB1, il est essentiel de comprendre les mécanismes d'action de ce composé au niveau moléculaire. Même si les gènes responsables de la biosynthèse de l'aflatoxine ainsi que certains gènes régulateurs ont été identifiés chez

A. flavus et que leurs rôles ont été en partie déterminés, les mécanismes d'action des différents composés anti-aflatoxinogènes restent souvent inconnus.

Afin d'apporter plus d'éléments à cette problématique, cette étude s'est attachée, dans un premier temps, à développer un outil moléculaire permettant d'explorer le mécanisme d'action de composés anti-aflatoxine et les interrelations pouvant exister entre la synthèse de ces mycotoxines et certains processus de la physiologie fongique. Ainsi, l'objectif de la première partie de nos travaux était de mieux comprendre les voies métaboliques et les signaux environnementaux mis en jeu dans l'inhibition de la synthèse de l'AFB1.

Ensuite, dans une seconde partie, nous nous sommes attachés à caractériser le potentiel anti-aflatoxinogène d'extraits aqueux de plantes médicinales couramment utilisées en région méditerranéenne. Notre intérêt s'est surtout porté sur les plantes qui sont capables d'inhiber la production d'AFB1 sans pour autant altérer le développement fongique. En effet, cela permet de garantir la sécurité du produit, sans modifier le microbiote et éviter ainsi l'émergence de nouvelles espèces potentiellement dangereuses. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'extrait d'hysope – *Micromeria graeca*. Son effet a été caractérisé en détail dans la troisième partie de ce travail.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE: AFLATOXINES

Afin de replacer nos travaux expérimentaux dans un contexte scientifique plus large, il est important de faire un bilan des données disponibles sur les aflatoxines et les moyens de lutte contre ces mycotoxines.

Dans **les deux premiers chapitres** de cette étude, nous allons présenter quelques données de base concernant les mycotoxines en général et les aflatoxines en particulier. **Le troisième chapitre** s'intéressera à la contamination des denrées alimentaires par les aflatoxines et soulignera leur importance tant sur le plan géographique qu'économique. Dans **le quatrième chapitre**, les conditions nécessaires au développement fongique et à la toxino-génèse seront présentées ainsi que les mécanismes de régulation de cette synthèse. Le **chapitre suivant** s'attachera à exposer les différents moyens de lutte déjà mis en place pour maîtriser le risque de contamination des matières premières par les aflatoxines tout en présentant aussi les limites d'utilisation. Enfin, **le dernier chapitre** présentera les données disponibles sur l'utilisation d'extraits naturels comme stratégie de lutte alternative contre les aflatoxines, ce qui représente le cœur du sujet de cette thèse

A. Les mycotoxines : des contaminants fréquents des aliments

A.1. Étymologie et définition

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires à faible poids moléculaire (<1000 Daltons) produits par des champignons filamenteux, plus particulièrement par ceux appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* et *Claviceps* (Marin et al., 2013). Ces métabolites sont non-essentiels au cycle de vie du champignon mais une fois produits, ils pourraient lui conférer certains avantages compétitifs (Fox and Howlett, 2008).

Le terme mycotoxine est une combinaison du mot Grec *mykos* (champignon) et du Latin *toxicum* (poison) (Jouany et al., 2009). C'est à l'occasion d'accidents toxiques survenus chez les animaux, en particulier celui ayant entraîné la mort de dindons d'élevage en Angleterre (Turkey X disease) que les mycotoxines ont été initialement identifiées. La découverte de ces molécules sur les productions végétales aux champs ou ensuite au cours du stockage, est devenue le sujet d'une interaction scientifique multidisciplinaire. Cela a permis la découverte de nombreuses mycotoxines potentiellement dangereuses pour l'homme et l'animal (Richard, 2007). À titre d'exemple, l'ochratoxine A (OTA), une mycotoxine fortement néphrotoxique produite par des espèces appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* a été découverte suite à une campagne destinée à identifier des mycotoxines parmi les métabolites secondaires fongiques en 1965 (Bennett and Klich, 2003; El Khoury and Atoui, 2010).

On réserve le terme de mycotoxines aux métabolites secondaires fongiques qui présentent une toxicité pour les humains et d'autres vertébrés (Bennett and Klich, 2003). De nos jours, 300 à 400 métabolites secondaires fongiques sont considérés comme des mycotoxines. Cependant, les recherches et les réglementations se concentrent plutôt sur une douzaine qui sont particulièrement toxiques pour l'homme et pour l'animal et qui sont donc considérés comme les plus importantes. Il s'agit des aflatoxines (AF), de l'ochratoxine A (OTA), des fumonisines (FUM, surtout FB1), de la patuline (PAT), de la zéaralenone (ZEN)

ainsi que quelques tricothécènes (HT-2, Toxin-T2 et deoxynivalénol DON) (FAO, 2004; Paterson, 2006).

Différentes voies métaboliques peuvent aboutir à la formation des mycotoxines. Ces dernières sont classées en 5 catégories selon leur structure et leur précurseur : les polycétides (PKS), les terpènes cycliques (TC), les peptides cycliques non-ribosomiques (NRPS), les indoles alkaloïdes (DMATS) et les hybrides (PKS/NRPS) (Keller et al., 2005) (Figure 1).

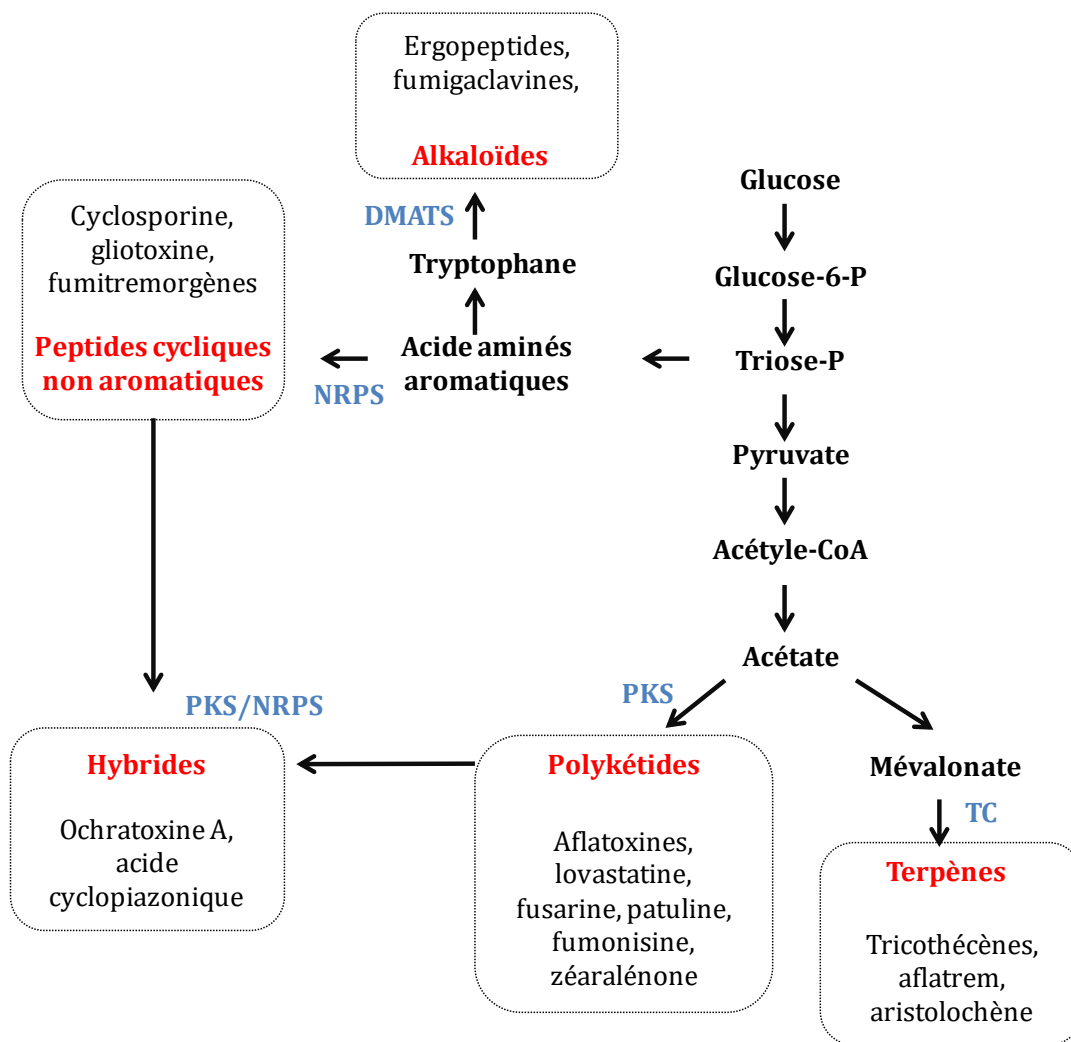


Figure 1. Les différentes voies métaboliques des mycotoxines

Abbréviations : NRPS, non-ribosomal peptide synthétase ; PKS, polycétide synthase ; TC, terpènes cyclase ;
DMATS, diméthyl allyl transférase.

A.2. Conditions de synthèse

Les champignons toxigènes sont classés en deux groupes majeurs : (i) les contaminants du champ pouvant infecter les plantes vivantes et (ii) ceux du stockage capables de se développer après la récolte, au cours du séchage, du stockage, du transport et de la distribution (Jouany et al., 2009). Parmi les contaminants du champ, *Fusarium graminearum* produisant le deoxynivalénol et le nivalenol et *F. verticillioïdes* produisant les fumonisines sont des phytopathogènes opportunistes des plantes sénescentes ou stressées. *A. flavus*, produisant les aflatoxines, est également considéré comme un contaminant pouvant coloniser les plantes au champ. Toutefois, ce dernier est aussi capable de produire des mycotoxines pendant le stockage (Alonso et al., 2013).

La production des mycotoxines dépend directement de la croissance fongique. Par conséquent, la production de ces contaminants dépend des conditions environnementales survenant avant et après la récolte, les facteurs les plus importants étant la température et l'humidité. Cependant la contamination par les mycotoxines peut aussi être favorisée par d'autres facteurs tels la disponibilité des micronutriments et les blessures des grains dues aux insectes (Milani, 2013). Cette production varie également selon les particularités physiologiques des espèces productrices. Certaines mycotoxines, telles les tricothécènes et la zéaralénone, produites par des espèces du genre *Fusarium* sont souvent associées aux céréales produites dans les pays tempérés (D'Mello and Macdonald, 1997) alors que celles produites par les espèces appartenant au genre *Aspergillus* sont des contaminants plus fréquents des climats chauds (Magan et al., 2011).

A.3. Prévalence des mycotoxines et contamination alimentaire

Une fois produites, les mycotoxines peuvent être retrouvées dans toutes les parties de la colonie fongique: les hyphes, le mycélium, les spores mais aussi dans le substrat sur lequel le développement a eu lieu (Bhat et al., 2010). L'exposition aux mycotoxines se fait essentiellement par voie orale suite à l'ingestion de denrées contaminées mais elle peut également avoir lieu par inhalation voire par contact (Jarvis and Miller, 2005; Klich, 2009; Zain, 2011).

Il convient également de souligner que, dans la majorité des cas, les consommateurs humains et animaux sont exposés à plusieurs mycotoxines. Ce constat est lié à trois raisons principales : (i) une mycotoxine peut être produite par plusieurs espèces fongiques différentes, (ii) inversement, une même espèce est parfois capable de produire simultanément plusieurs mycotoxines, (iii) les repas (ou rations chez les animaux) sont généralement constitués de plusieurs aliments ou d'aliments préparés à partir de plusieurs matières premières, chacune pouvant être une source d'une toxine différente (Alassane-Kpembé et al., 2016). Cette fréquence de la multi-contamination des aliments a été confirmée par plusieurs enquêtes (Schatzmayr and Streit, 2013; Streit et al., 2013b). Du point de vue toxicologique, des études sur des modèles *in vivo* (Grenier, 2011) et *in vitro* (Alassane-Kpembé et al., 2016; Smith et al., 2016), ont confirmé des interactions possibles entre certaines mycotoxines différentes. Ces interactions peuvent être classées en effets antagonistes, additifs ou synergiques et varient selon la dose et le ratio des mycotoxines en question.

Les mycotoxines peuvent contaminer de nombreux produits alimentaires comme les céréales (maïs, blé, riz, orge, etc.), les graines oléagineuses (arachides, coton), les fruits secs (pistaches, noix, figes séchées, etc.), les épices, etc (Marin et al., 2013). Selon une enquête menée à l'échelle internationale par la société BIOMIN GmbH en 2014 sur les aliments destinés au bétail (fourrage, maïs, blé, soja et ensilage), le DON et les FUM sont les toxines les plus fréquemment observées, retrouvées dans plus de la moitié des échantillons testés. Dans une autre enquête menée entre 2004-2011 sur les denrées agricoles à destination de la consommation animale, 72% des 19 000 échantillons analysés présentaient des taux détectables d'AF, FUM, DON, ZEN ou OTA (Schatzmayr and Streit, 2013). Cette dernière enquête a montré une augmentation de la contamination par les aflatoxines qui est passée de 11% (en 2005) à 52% (en 2009) et 40% (en 2011). En vue de l'augmentation de son incidence affectant l'ensemble des régions, l'occurrence de la contamination par les mycotoxines ne semble se restreindre à des événements climatiques ponctuels. Elle pourrait éventuellement être en lien avec les changements climatiques globaux (Streit et al., 2013a).

Les mycotoxines peuvent être également présentes dans les produits qui ont subi les procédés industriels de transformation ayant permis d'éliminer les moisissures. En effet, la grande stabilité de leurs structures les rend résistantes aux températures élevées pouvant être appliquées au cours des étapes de fabrication et de transformation des aliments (Bullerman and Bianchini, 2007; CAST, 2003).

A.4. Impact sur les hommes et les animaux

Les mycotoxines ont, par définition, des effets néfastes sur la santé de l'homme et des animaux. Ces effets peuvent néanmoins être très variables en fonction des toxines (et de leur structure), mais aussi de la dose et de la durée d'exposition (Bennett and Klich, 2003). On pourra ainsi distinguer des mycotoxicoses aiguës, observées lors d'exposition courte à des concentrations élevées en toxines et des intoxications subaiguës qui apparaissent lors d'expositions plus prolongées (plusieurs semaines à plusieurs mois) à de faibles concentrations. Les principaux effets délétères des mycotoxines sont liés à leur potentiel carcinogène, mutagène, immunosuppresseur, hépatotoxique, neurotoxique et irritatif (Steyn, 1995). Le **Tableau 1** regroupe les mycotoxines réglementées en Europe, les denrées les plus souvent contaminées ainsi que leurs effets avérés sur la santé.

Les aflatoxines et surtout l'aflatoxine B1 (AFB1) restent les toxines les plus recherchées et les plus strictement réglementées à cause de leur toxicité importante.

Tableau 1. Principales mycotoxines faisant l'objet de seuils réglementaires, principales moisissures productrices associées, denrées fréquemment contaminées et effets toxiques majeurs (AFSSA, 2009; CAST, 2003; Krska and Crews, 2008).

Mycotoxines	Principales moisissures productrices	Denrées contaminées	Toxicité
Aflatoxines B1, B2, G1, G2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	Maïs, arachides, blé, graines de coton, noix, riz, fruits secs et épices	Hépatotoxicité, Cancérogénicité, Génotoxicité, Immunotoxicité, Tératogénicité
Ochratoxine A	<i>Penicillium verrucosum</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i>	Céréales, grains de cacao et de café, vin, jus de raisin, bière, épices, boudins et rognons	Néphrotoxicité, Immunotoxicité, Tératogénicité,
Patuline	<i>P. expansum</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>Byssoschlamys nivea</i>	Pomaceae (pommes, poires), jus de fruits	Neurotoxicité, Génotoxicité, Cytotoxicité
Fumonisines B1, B2, B3	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>	Céréales (maïs, riz, sorgho)	Cancérogénicité, Neurotoxicité
Trichothécène (DON)	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. sporotrichoides</i> , <i>F. langsethiae</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. equiseti</i>	Céréales (blé, maïs, orge, sarrasin, seigle, millet, riz, avoine), fruits (bananes)	Immunotoxicité, Effets hématopoïétiques, Troubles digestifs
Trichothécènes (T-2 et Toxine HT-2)	<i>Fusarium tricinctum</i> , <i>F. langsethiae</i> , <i>F. sporotrichoides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. equiseti</i>	Céréales (blé, maïs, avoine, orge, riz, fèves, soja)	Génotoxicité, Immunotoxicité, Reprotoxicité, Neurotoxicité
Zéaralénone	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i>	Céréales (maïs, sorgho, orge, soja, blé, riz, avoine)	Reprotoxicité, Immunotoxicité
Alcaloïdes d'ergot	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>C. paspali</i> , <i>C. africana</i> , <i>C. fusiformis</i>	Seigle, blé, triticales (croisement entre blé et seigle)	Neurotoxicité, Troubles digestifs, Vasoconstriction

B. Généralités sur les aflatoxines

Le nom aflatoxine est un acronyme formé de la combinaison de la lettre « A » pour *Aspergillus* et « FLA » pour *flavus*. Ce nom est issu de l'espèce impliquée dans la contamination des aliments responsables de la Turkey « X » disease : *Aspergillus flavus*. On y associe le mot anglais « TOXIN » signifiant poison (Rustom, 1997).

B.1. Caractéristiques biochimiques

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 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 furanocoumarines (**Figure 2**). 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 Monograph, 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 difuranocoumarin. 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).

Les aflatoxines sont des molécules stables et très résistantes aux différents procédés de transformation alimentaire 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 Monograph, 2002).

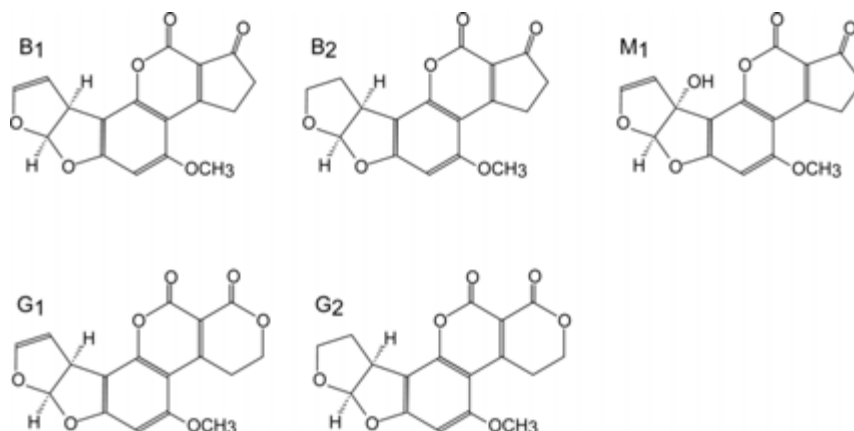


Figure 2. Structure des 5 principales aflatoxines AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 et AFM1

Bien que le terme « aflatoxine » englobe toute la famille, il est souvent utilisé pour désigner uniquement l’AFB1, cette dernière étant la molécule la plus fréquente dans les aliments mais aussi la plus toxique.

B.2. Toxicité

La toxicité des aflatoxines et en particulier de l’aflatoxine B1 dépend de la concentration et de la durée d’exposition mais aussi d’autres paramètres tels que l’âge, le sexe, l’espèce concernée et sa tolérance, le statut nutritionnel, etc. Si les effets de ces toxines sont bien documentés chez les animaux, leurs effets chez l’homme ont aussi pu être rapportés à l’occasion d’accidents toxiques aigus ou à cause de l’exposition fréquente de certaines populations, dans les zones géographiques où la contamination des aliments est fréquente.

B.2.1. Toxicité aiguë

Les cas d’aflatoxicoses aiguës chez les humains sont très rares de nos jours. Ces accidents toxiques ont lieu suite à l’ingestion de grandes quantités d’aflatoxines et ne semblent apparaître que dans certaines conditions particulières de pénurie, qui obligent la population à consommer des matières premières normalement écartées de la consommation. Par exemple, la plus grande intoxication due aux aflatoxines a eu lieu au Kenya en 2004, où 317 cas d’aflatoxicoses aiguës ont été signalés entraînant la mort de 125 personnes à cause de l’ingestion de maïs contaminé par de fortes concentrations d’AFB1 (> 1000 ppb) (Lewis et al., 2005). L’organe cible des aflatoxines est le foie. En effet, au cours

de la métabolisation hépatique, l'apparition d'un dérivé époxyde très instable entraîne une interaction de ce dernier avec les macromolécules des cellules hépatiques et une mort cellulaire lorsque ces interactions sont trop nombreuses. Ainsi, les signes d'une aflatoxicose aiguë incluent une jaunisse liée à une nécrose hémorragique du foie et une encéphalopathie hépatique ; ces symptômes pouvant être létaux dans 25% des cas. Les adultes ont généralement une plus grande tolérance aux aflatoxines que les enfants dont le renouvellement cellulaire plus rapide augmente la sensibilité (Williams et al., 2004; Wu et al., 2014).

On peut signaler que l'utilisation de l'AFB1 a été envisagée comme arme chimique en Iraq durant la guerre dans les années 1980s. Cependant, son efficacité n'est pas immédiate puisque la toxicité aiguë de l'AFB1 est relativement limitée par rapport à celle d'autres mycotoxines comme la toxine T-2, un trichothécène produit par des espèces de *Fusarium* (Paterson, 2006; Stone, 2002).

B.2.1. Toxicité chronique

Si l'organe cible majeur de l'AFB1 est le foie, elle peut également agir sur d'autres fonctions physiologiques représentés dans la **Figure 3**.

Néanmoins, l'effet toxique principal de l'AFB1 reste lié à son hépatotoxicité et à l'interaction entre le dérivé époxyde et l'ADN des hépatocytes. En effet, cette interaction est à l'origine de l'apparition de cancers du foie lors d'exposition prolongée à de faibles concentrations en AFB1.

B.2.1.1. AFB1 agent carcinogène

L'AFB1 est le cancérigène naturel le plus puissant que l'on connaisse. Elle a été classée par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) en 1993 dans le groupe 1 des molécules cancérigènes pour l'homme et l'animal. Ce classement est issu des données épidémiologiques démontrant un lien étroit entre l'exposition à l'AFB1 et le développement du cancer de foie (HCC) ou « Hepatocellular Carcinoma ». L'HCC est le cancer le plus commun au monde et la 3ème cause de mortalité due au cancer à l'échelle

mondiale (Bbosa et al., 2013). D'autres études ont aussi souligné le rôle de l'AFB1 dans le développement d'autres types de cancer tels le cancer du rein, du système respiratoire et du tractus gastro-intestinal (GIT) (Bbosa et al., 2013; Cui et al., 2015). Depuis 2002, le mélange des 4 aflatoxines majeures (AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2) fait également partie du groupe 1 des carcinogènes.

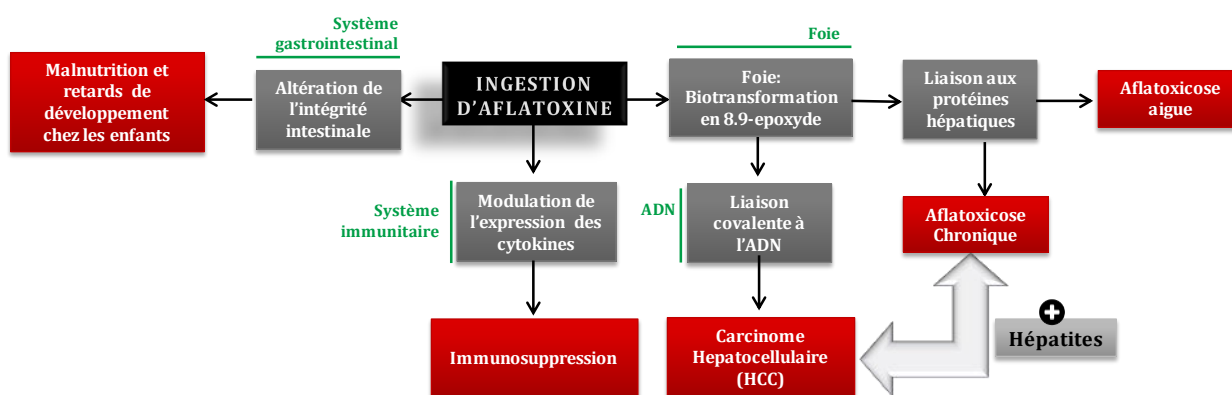


Figure 3. Différents niveaux physiologiques de la toxicité de l'AFB1

Schéma adapté et modifié de USAID, 2012 et Wu & Khlangwiset, 2010.

Suite à son ingestion, l'AFB1 est métabolisée dans le foie par deux cytochromes P450 (CYP3A4 et CYP1A2) (Bbosa et al., 2013). Ces deux enzymes catalysent la biotransformation de l'AFB1 en deux époxydes AFB1-8,9-endo-époxyde et AFB1-8,9-exo-époxyde. C'est cependant ce dernier qui est prédominant, hautement réactif et capable de s'intercaler entre les bases de l'ADN pour former des adduits 8,9-dihydro-8-(N7-guanyl)-9-hydroxy-AFB1 (AFB1-N7-Gua) conférant les propriétés mutagènes à l'AFB1. La mutation du codon 249 du gène *p53* chez les humains, l'induction de recombinaisons mitotiques et les réarrangements de minisatellites promouvant une instabilité génomique, sont tous des facteurs contribuant à la formation de tumeurs dans le foie et par conséquent à l'installation de l'HCC.

Il existe une synergie entre l'AFB1 et le virus de l'hépatite B. Des individus qui sont séropositifs pour l'hépatite B (HBsAg+) et qui sont exposés à des doses élevées de l'aflatoxine B1, sont 10 fois plus susceptibles de développer l'HCC que ceux qui habitent des régions à faible exposition aux aflatoxines. Le risque de développer l'HCC chez les

personnes HBsAg+ consommant une alimentation faiblement contaminée en aflatoxines est comparable à celles HBsAg–fortement exposées aux aflatoxines (Yeh et al., 1989).

B.2.1.2. Effet tératogène

L'AFB1 peut aussi traverser la barrière placentaire et donc contaminer les foetus *in utero*. Des adduits aflatoxine-albumine (AF-ALB) ont été identifiés dans le sang des mères et celui du cordon ombilical de nouveaux nés en Gambie (Wild et al., 1991). L'enzyme CYP3A7 qui est la forme majeure de cytochrome P450 présente dans le foie fœtal humain, est également capable de transformer l'AFB1 en son dérivé 8,9-époxyde (Wild and Turner, 2002), induisant ainsi l'apparition d'effets tératogènes et des malformations congénitales (Bbosa et al., 2013).

B.2.1.3. Effet immunosuppresseur

Outre son pouvoir cancérigène, l'AFB1 est un composé immunosuppresseur, diminuant la résistance aux infections parasitaires, bactériennes et fongiques. En effet, l'AFB1 module la réponse cellulaire en diminuant l'activité des lymphocytes B et T et des cytokines inflammatoires. Cela contribue à favoriser des infections chroniques (Marin et al., 2013; Meissonnier et al., 2008) et constitue un vrai risque pour les personnes immunodéficientes. Ainsi, les adduits formés par les aflatoxines (AF-ALB) accentuent les dommages au système immunitaire chez les personnes séropositives au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Jiang et al., 2008).

B.2.1.4. Malnutrition et troubles du développement chez les enfants

L'altération du système gastro-intestinal est aussi une conséquence possible de l'exposition aux aflatoxines. Ainsi, des études épidémiologiques ont montré une corrélation entre niveau d'exposition à l'AFB1 et retard du développement chez les enfants (Wu et al., 2014). De plus, les cas de malnutritions fréquents dans les pays en développement peuvent aggraver les effets des aflatoxines. Une malnutrition protéique induit des perturbations au niveau des oxydases hépatiques favorisant l'accumulation des aflatoxines dans le corps (Enwonwu, 1984).

B.3. Règlements

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 de consommation quotidienne d'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).

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 dose maximale pour les AFt dans les aliments destinés au bétail et aux volailles est de 100 ppb (Food and Drug Administration, 2016). 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).

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 2**).

Tableau 2. Valeurs réglementaires en vigueur en UE pour les aflatoxines dans l'alimentation humaine et animale (μg d'AF par kg de matrice alimentaire) selon la Directive 2002/32/EC du 7 Mai 2002 et le Commission (EC) No 1881/2006 du 19 Décembre 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	
Epices	10		
Aflatoxine M1	Lait	0,05	
	Préparations pour les enfants	0,025	
Alimentation Animale	Aflatoxine B1	Matières premières	20
		Fourrage en mélange	5 pour les animaux laitiers 10 pour les veaux et agneaux 20 pour le bétail et autres animaux

C. Contamination des aliments et impact mondial

C.1. Denrées contaminées

A. flavus est surtout connu pour être un contaminant fréquent des cultures de maïs, d'arachides, de coton, de noix et d'autres graines oléagineuses, dans les régions où les conditions hydro-thermiques sont favorables à sa croissance (Cary et al., 2011 ; Marin et al., 2011 ; Sinha and Bhatnagar, 1998 ; Diener and Davis, 1977).

La **Figure 4** schématise le cycle infectieux d'*A. flavus*, présent sous forme saprophyte dans le sol, et transporté par des insectes ou par le vent, pour atteindre les cultures de maïs et commencer le processus d'infection.

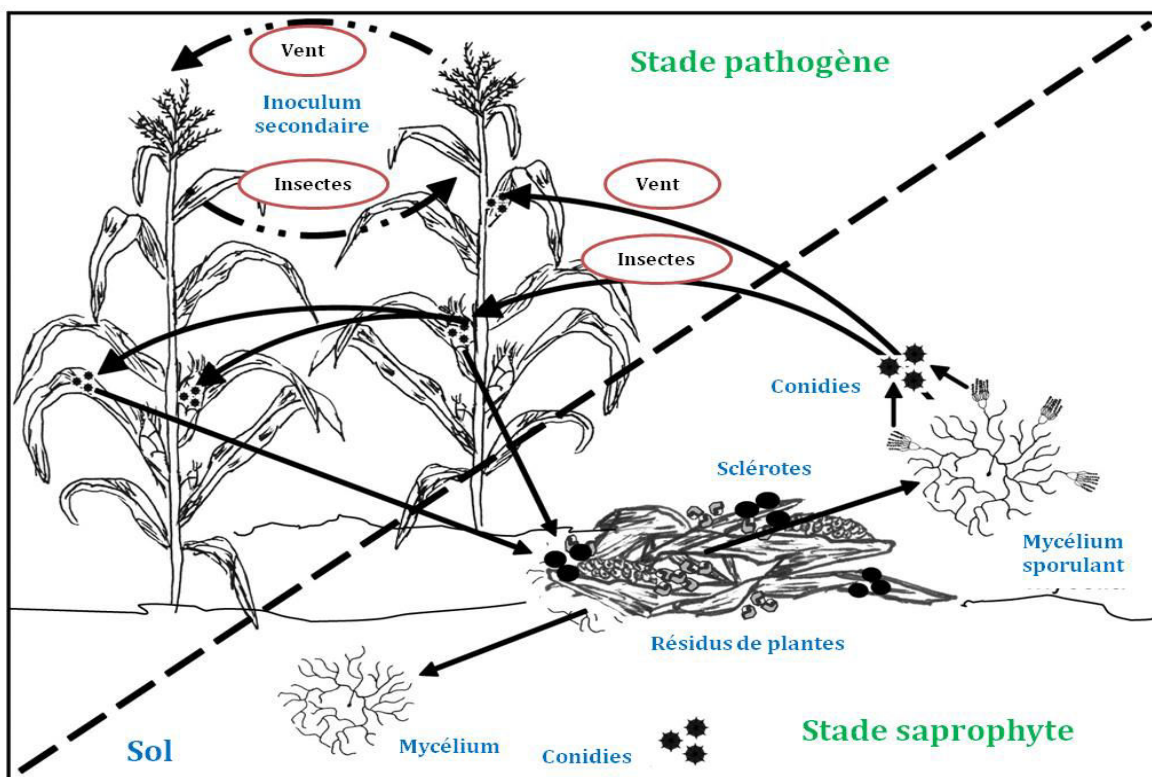


Figure 4 Cycle infectieux d'*A. flavus*, saprophyte du sol, sur des cultures de maïs
Schéma adapté et modifié de Abbas et al, 2009.

En marge des raisons biogéographiques, l'affinité à ces substrats est aussi due à leur composition particulière et au mode d'utilisation du carbone par *A. flavus*. Ainsi, dans les grains de maïs et de coton, *A. flavus* utilise d'abord les sucres libres, puis les lipides avant de commencer à dégrader l'amidon. Ainsi, une délipidation des graines de coton a permis de diminuer de 800 fois la production de l'aflatoxine B1 dans ces grains (Klich, 2007).

D'autres substrats sont aussi sensibles à une contamination par *A. flavus* et par les aflatoxines. Des taux significatifs d'AFB1 peuvent également être trouvés sur du blé (Rodrigues and Naehrer, 2012), des épices (EL Mahgubi et al., 2013), des fruits secs (Juan et al., 2008) et des grains de café et de cacao (Nakajima et al., 1997; Sánchez-Hervás et al., 2008).

Les produits laitiers (lait, fromages), les œufs ou les viandes (surtout séchées) provenant des animaux qui ont ingéré des quantités importantes d'AFB1 peuvent aussi être une source mineure indirecte de contamination pour les hommes. Cependant, les aflatoxines détectées dans ces produits sont plutôt des métabolites de l'AFB1 (majoritairement AFM1) issus de sa biotransformation dans le foie de ces animaux. Des traces d'AFB1 peuvent être détectées dans les produits animaux seulement si les quantités initiales ingérées sont suffisamment importantes (Bailly and Guerre, 2009; Herzallah, 2009; Hymery et al., 2014). Des quantités plus importantes peuvent être détectées dans la viande et les œufs de volailles qui semblent être plus sensibles à une contamination par l'AFB1 (Herzallah, 2013). De plus, des quantités d'AFM1 peuvent aussi être transférées aux nourrisson par le lait des mères consommant des aliments contaminés par l'AFB1 (Elzupir et al., 2012).

C.2. Distribution géographique et exposition aux aflatoxines

Il est estimé que, de nos jours, 4,5 milliards de personnes vivant dans des pays en développement en Asie et Afrique sont exposées de manière chronique aux aflatoxines (Jaynes and Zartman, 2011). Selon l'enquête de la société BIOMIN GmbH en 2014, sur des denrées utilisées pour l'alimentation des animaux tels le maïs, le blé, le riz, le foin, la farine de soja, le gluten de maïs, etc., les aflatoxines présentent un problème majeur en Asie et sont retrouvées respectivement dans 84 et 67% de l'ensemble des échantillons analysés au

Sud et Sud-Est du continent. La fréquence de contamination semble d'ailleurs augmenter puisque, en 2005, les aflatoxines étaient détectées dans seulement 32% de ces denrées (Schatzmayer and Streit, 2013). En Afrique, les aflatoxines sont aussi un problème majeur puisque le climat et les pratiques agricoles sont souvent favorables à la contamination. Cela s'est traduit par l'apparition de plusieurs épidémies au cours des années (Wagacha and Muthomi, 2008). On estime que 98% de la population de l'Afrique de l'Ouest est exposée quotidiennement aux aflatoxines en particulier à cause de la consommation importante et régulière de maïs et d'arachides, souvent contaminés dans ces régions (Perrone et al., 2014b; Wagacha and Muthomi, 2008). Une étude effectuée en Afrique de l'Ouest, au Bénin et au Togo, a également montré que 99% des enfants âgés de 9 mois à 5 ans sont exposés aux aflatoxines. Cette exposition est particulièrement élevée chez les enfants entre 1 et 3 ans et a été fortement liée au sevrage (Gong et al., 2003).

Si le climat des pays tropicaux et subtropicaux est particulièrement favorable à la croissance fongique et la production d'aflatoxines, il faut signaler que les changements climatiques globaux en cours pourraient progressivement modifier la répartition mondiale de ces toxines (Magan et al., 2011). Les augmentations de températures observées en Europe du Sud (4-5°C) et de l'Ouest (2,5-3,5°C), associées à une diminution de la fréquence des précipitations sont, en effet, favorables au développement d'*A. flavus* (Medina et al., 2014). Ainsi, depuis plusieurs années, des cas de contamination de productions européennes ont été signalés, notamment dans le sud de l'Europe comme en Italie ou en Espagne (Cano-Sancho et al., 2013; Ibáñez-Vea et al., 2012; Perrone et al., 2014a). Depuis quelques années, une contamination fréquente et importante du lait produit en Serbie par l'AFM1 semble aussi montrer une contamination des céréales produites dans cette région (Kos et al., 2014; Škrbić et al., 2014).

Les **Tableaux 3** et **4** récapitulent les résultats des publications des 3 dernières années concernant l'occurrence et les taux de contamination par l'AFB1 dans des échantillons de maïs ou des aliments à base de maïs et par l'AFM1 dans le lait et les produits laitiers en fonction des régions du monde.

On peut aussi noter que, en marge de l'exposition aux aflatoxines par ingestion directe des produits végétaux ou indirecte, à travers les produits d'origine animale, les aflatoxines peuvent également être inhalées avec des spores fongiques. En effet, ces dernières peuvent contenir des quantités significatives de toxine (Pitt, 1994). Les travailleurs agricoles tels les laboureurs, les personnes qui nettoient les lieux de stockage des céréales, les travailleurs dans les industries de transformation des matières premières peuvent ainsi être exposés par voie aérienne à ces toxines (IARC, 2002). Cependant, cette voie d'exposition reste largement minoritaire par rapport à l'ingestion.

Tableau 3. Occurrence de l'AFB1 dans le maïs et les denrées alimentaires à base de maïs en Europe, Asie de l'Est et Afrique depuis 2013.

Région	Pays	Denrée	Nb d'échantillons AFB1+/total	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 et al., 2015)
	Turquie	Farine de maïs	16/24 (66,7%)	0 >5 ppb	0,41-1,12 µg/kg	(Kara et al., 2015)
	Serbie	maïs	137/200 (68,5%)	107 (53,5%) >5 ppb	1,01-86,1 µg/kg	(Kos et al., 2013)
	Croatie	maïs	305/972 (31,4%)	211 (21,7%) >5 ppb	1,1-2072 µg/kg	(Pleadin et al., 2015, 2014)
Asie de l'Est	Chine	maïs pour fourrage	68/98 (69%)	35 (17,3%) >20 ppb	2-300 µg/kg	(Liu et al., 2016)
	Inde	maïs	25/45 (55,5%)	19 (42,2%) >5 ppb	20,6-402,4 µg/kg	(Mohana et al., 2014)
Afrique	Malawi	Chips à base de maïs	9/12 (75%)	9 (75%) >5 ppb	0,1-1,4 µg/kg	(Matumba et al., 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 et al., 2016)
	Nigeria	maïs	50/120 (41,6%)	0 (0%) >5 ppb	0,14-0,22 µg/kg	(Okeke et al., 2015)

Tableau 4 Occurrence d'AFM1 dans différents types de lait ou produits laitiers en Europe, Asie de l'Est et au Moyen Orient depuis 2012.

Région	Pays	Denrée	Nb d'échantillons AFM1+/total	Échantillons dépassant les normes EU (>0,05 ppb)	Niveau de contamination	Références
Europe	Serbie	Lait UHT + pasteurisé	148/150 (99%)	129 (86%)	0,01-1,2 µg/L	(Kos et al., 2014; Škrbić et al., 2014)
Asie de l'Est	Inde	Lait UHT	32/52 (62%)	25 (48%)	<0,02-2,1 µg/L	(Siddappa et al., 2012)
		Lait pasteurisé	3/7 (43%)	3 (43%)	1,8-3,8 µg/L	
		Lait cru	45/45 (100%)	22 (49%)	0,1-3,8 µg/L	
	Chine	Lait UHT	84/153 (55%)	31 (20%)	0,048 ± 0,047 µg/L	(Zheng et al., 2013)
		Lait pasteurisé	25/26 (96%)	17 (65%)	0,072 ± 0,041 µg/L	
	Brazil	Lait UHT	23/75 (31%)	23 (31%)	1-4,2 µg/L	(Oliveira et al., 2013)
Moyen Orient	Iran	Lait cru	39/40 (98%)	4 (10%)	0,007-0,068 µg/L	(Mohajeri et al., 2015)
		Lait pasteurisé	45/47 (96%)	1 (2%)	0,001- 0,0581 µg/L	
	Pakistan	Lait	76/107 (71%)	44 (41%)	4-845,4 ng/L	(Iqbal and Asi, 2013)
		Yaourt	59/96 (61%)	28 (29%)	4-615,8 ng/L	
		Fromage blanc	93/119 (78%)	55 (46%)	4-595,4 ng/L	
		Fromage à tartiner	89/150 (59%)	64 (43%)	4-456,3 ng/L	
		Beurre	33/74 (45%)	17 (23%)	4-413,4 ng/L	
	Liban	Produits laitiers divers	193/388 (50%)	30 (11,8%)	32,77 ± 1,97 ng/kg	(Hassan and Kassaify, 2014)

C.3. Importance économique

Outre leur importance sanitaire, les aflatoxines sont aussi responsables de pertes économiques majeures.

En effet, l'existence de valeurs maximales tolérables dans les aliments fixées par plus de 100 nations dans le monde et destinées à protéger les consommateurs contre les effets néfastes de ces mycotoxines, entraîne une diminution très importante (voire une destruction) de la valeur marchande des lots identifiés comme contaminés par ces toxines. Elles en limitent en effet à la fois l'usage et la distribution.

Ces pertes sont ainsi estimées entre 52,1 millions et 1,68 milliard de dollars chaque année aux Etats Unis. Elles sont positivement corrélées à la température et atteignent leur maximum les années considérées chaudes, telle 2012 (Mitchell et al., 2016). Au niveau mondial, la FAO estime qu'environ le quart de la production agricole mondiale est contaminé par des mycotoxines. Selon l'Institut International d'Agriculture Tropicale (ITTA 2013), les pertes annuelles dues aux aflatoxines seules atteignent 1,2 milliards de dollars américains, les pays Africains subissant 38% de ces pertes, soit 450 millions de dollars (Marechera, 2015). En outre, il existe aussi des pertes indirectes, plus difficiles à évaluer et qui sont liées à la diminution de productivité des animaux recevant une alimentation contenant des aflatoxines (CAST, 2003).

D. Conditions de production, voie de biosynthèse et régulation

D.1. Les espèces productrices d'aflatoxines

D.1.1. Les *Aspergillus*

Le genre *Aspergillus* regroupe environ 250 espèces (Klich, 2007). Il est caractérisé par une structure particulière (**Figure 2**) ressemblant à l'aspergillum, un instrument utilisé pour asperger l'eau bénite, et qui a inspiré à Micheli, un prêtre catholique, ce nom en 1729 (Klich, 2009).

Pendant des décennies, il a été admis que *A. flavus* et *A. parasiticus* étaient les seuls producteurs d'aflatoxines ; *A. flavus* responsable de la production des aflatoxines de type B et souvent de l'acide cyclopiazonique (ACP) et *A. parasiticus* produisant les aflatoxines B et G sans produire de l'ACP. Toutefois la liste des espèces productrices s'est étendue, même si leur occurrence semble moins fréquente que les deux espèces majeures mentionnées. Le développement des outils de biologie moléculaire a en effet permis d'étendre la liste des espèces productrices d'aflatoxines à une vingtaine, toutes appartenant au genre *Aspergillus* et réparties sur les sections: *Flavi*, *Nidulantes* et *Ochraceorosei* (**Tableau 5**). Le genre *Emericella* était considéré comme téléomorphe d'*Aspergillus*, avant qu'il ne rejoigne ce dernier suite à l'adoption du principe « un champignon : un nom » par le « International Botanical Congress Nomenclature Section » à Melbourne. Le nom d'*Aspergillus* a été choisi pour désigner les espèces en regroupant ainsi des espèces ana- et téléomorphes (Samson et al., 2014). Des souches d'*Aschersonia coffeae* et *As. Marganita*, deux espèces fongiques entomopathogènes pouvant se développer sur la paroi des cochenilles, insectes phytoparasites, ont aussi été identifiées comme capables de produire des aflatoxines (Kornsakulkarn et al., 2012, 2013). La plupart des espèces toxigènes produit les aflatoxines de type B. Les espèces proches d'*A. parasiticus* et *A. nomius* sont aussi capables de produire les aflatoxines de type G (Varga et al., 2015).

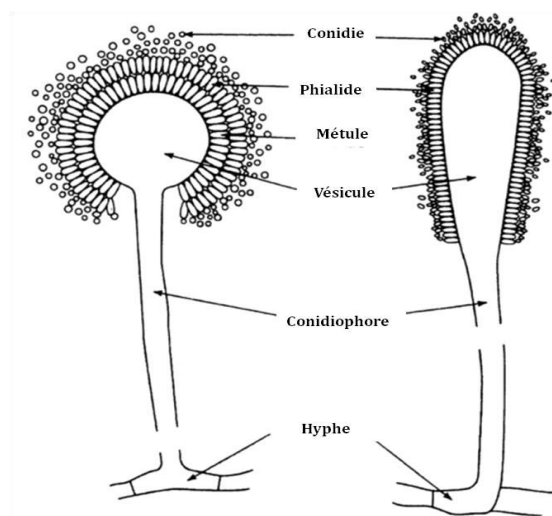


Figure 5. Structure typique d'un *Aspergillus* bisérié (à gauche) et unisérié (à droite)

D.1.2. *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*

Les deux espèces aflatoxinogènes majeures restent *A. flavus* et *A. parasiticus*, qui sont le plus souvent responsables de la production de quantités importantes d'aflatoxines dans les matrices alimentaires au niveau mondial. Ces deux espèces présentent un certain nombre de différences morphologiques et moléculaires (El Khoury et al., 2011).

D.1.2.1. *Aspergillus flavus*

Les colonies d'*A. flavus* sont vert-jaunâtre à vert-olive, relativement planes. L'exsudat est discret. Les revers sont incolores à rosâtres sur Czapek et jaunâtres sur MEA. Certaines colonies peuvent présenter des sclérotés brunes ou noirs, globoses et de taille variable (>400 µm) (**Figure 6**). Les conidiophores sont longs et d'une taille généralement inférieure à 1 mm. Leur paroi est épaisse et très rugueuse. La vésicule est globuleuse ou sub-globuleuse (10 à 65 µm de diamètre). Les têtes sont radiées et majoritairement bisériées (2 rangées de stérigmates). Les conidies sont lisses ou légèrement rugueuses (Hedayati, 2007; Samson, 2010). De petites têtes en colonne sont possibles dans le mycelium aérien. Ce caractère est plus ou moins marqué en fonction des souches.

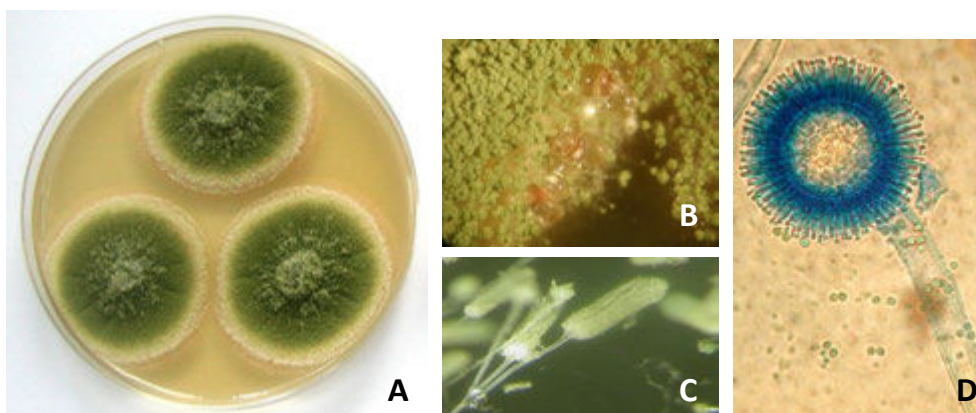


Figure 6. Colonies d'*A. flavus* sur MEA après 5 jours de culture à 27°C. **A.** Aspect macroscopique. **B.** Mycélium basal avec têtes radiées et sclérotés, vue à la loupe binoculaire X 20. **C.** Têtes en colonne dans le mycélium aérien, vue à la loupe binoculaire X 120. **D.** Conidiophore classique portant une tête radiée bisériée, vue au microscope X 400 (photos S. Bailly).

D.1.2.2. *Aspergillus parasiticus*

Les colonies d'*A. parasiticus* sont vert foncé, couleur lierre et plus floconneuses et profondes que celles d'*A. flavus* sur milieu MEA (**Figure 7**). Le revers est clair sur Czapek et

MEA. Les sclérotos sont possibles (100-500 μm). Les conidiophores sont incolores, de taille variable (300-700 μm) et leur paroi est lisse ou rugueuse dans la partie distale. Les vésicules sont globuleuses (20-35 μm) et les têtes sont radiées et pour la plupart unisériées (>90%). Les conidies sont globuleuses et très échinulées voire épineuses (3,5-5,5 μm) (Hedayati et al., 2007; Samson et al., 2010).

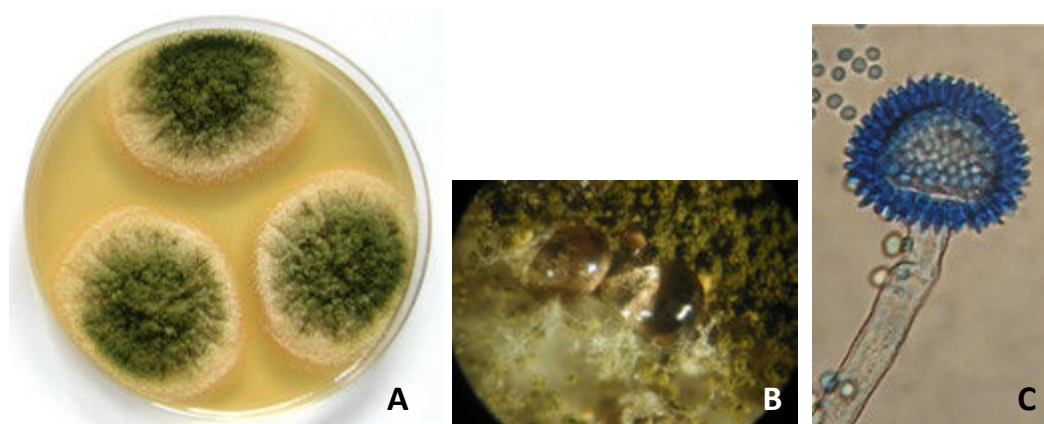


Figure 6. Colonies d'*A. parasiticus* sur MEA après 5 jours de culture à 27°C. **A.** Aspect macroscopique. **B.** Mycélium basal avec têtes radiées et sclérotos, vue à la loupe binoculaire X20. **C.** Conidiophore classique avec une tête unisériée, des spores rugueuses, vue au microscope X400 (photos S. Bailly).

D.1.2.3 Prévalence de ces deux espèces

La prévalence d'*A. parasiticus* semble plus faible que celle d'*A. flavus*, et se limite à quelques denrées, comme par exemple les arachides (IARC Monograph, 2002; Klich, 2007). Toutefois, des études taxonomiques utilisant des méthodes phénotypiques et moléculaires ont plutôt associé la contamination des arachides aux souches d'*A. arachidicola* et *A. minisclerotigenes* (Pildain et al., 2008). *A. parasiticus* est rarement détecté dans des cultures de maïs contaminées par l'aflatoxine. Ainsi, *A. flavus* est considérée selon plusieurs études comme l'espèce fongique la plus préoccupante pour sa capacité à se développer sur différentes denrées agricoles et matrices alimentaires et y produire de l'aflatoxine B1, aux champs comme lors du stockage (Amaike & Keller, 2011; Baranyi, 2013; Varga et al., 2015).

Il est important de noter également que la capacité d'*A. flavus* à se développer à des températures relativement élevées contribue également à sa pathogénicité envers les hommes et autres animaux à sang chaud (Mahendra and Kovics, 2010). *A. flavus* est ainsi

considéré comme la deuxième cause d'aspergillose chez les humains après *A. fumigatus*. *A. flavus* est responsable de 10-20% des cas enregistrés (Krishnan, 2009) et engendre également des problèmes ophtalmiques, surtout en Inde (Selvam et al., 2015).

Tableau 5. Liste des 20 espèces aflatoxinogènes appartenant aux sections *Flavi*, *Ochraceo-rosei* et *Nidulantes* ainsi que les autres mycotoxines majeures qu'elles produisent, adapté de Varga et al., (2015).

Section	Espèce	Types d'AFs produites	Autres mycotoxines
Flavi	<i>A. arachidicola</i>	B1, B2, G1 et G2	AK, AA
	<i>A. bombycis</i>	B1, B2, G1 et G2	AK, AA
	<i>A. flavus</i>	B1 et B2	AK, AA, ACP
	<i>A. minisclerotigenes</i>	B1, B2, G1 et G2	AK, AA, ACP
	<i>A. nomius</i>	B1, B2, G1 et G2	AK, AA, AT
	<i>A. novoparasiticus</i>	B1, B2, G1 et G2	AK
	<i>A. parasiticus</i>	B1, B2, G1 et G2	AK, AA
	<i>A. parvisclerotigenus</i>	B1, B2, G1 et G2	AK, ACP
	<i>A. pseudocaelatus</i>	B1, B2, G1 et G2	AK, ACP
	<i>A. pseudonomius</i>	B1, B2, G1 et G2	AK
	<i>A. pseudotamarii</i>	B1	AK, ACP
	<i>A. togoensis</i>	B1	ST
	<i>A. transmontanensis</i>	B1, B2, G1 et G2	AA
	<i>A. mottae</i>	B1, B2, G1 et G2	AA, ACP
<i>A. sergii</i>	B1, B2, G1 et G2	AA, ACP	
Ochraceo-rosei	<i>A. ochraceoroseus</i>	B1 et B2	ST
	<i>A. rambellii</i>	B1 et B2	ST
Nidulantes	<i>A. astellatus</i> (= <i>Emericella astellata</i>)	B1	ST, TR
	<i>A. olivicola</i> (= <i>Emericella olivicola</i>)	B1	ST, TR
	<i>A. venezuelensis</i> (= <i>Emericella venezuelensis</i>)	B1	ST, TR

AA = acide aspergillique, ACP = acide cyclopiazonique, AK = acide kojique, AT = acide tenuazonique, ST = stérigmatocystine, TR = terréine.

D.2. Conditions de développement et d'aflatoxinogénèse

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 (type et a_w), (iii) les conditions climatiques (latitude, 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 and Naehrer, 2012; Streit et al., 2013b, 2012).

D.2.1. Particularités de la souche fongique

A. flavus est capable de produire des enzymes hydrolytiques telles que 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 (Shinha and Bhatnagar, 1998).

D.2.2. Nature du substrat

A. flavus est une espèce saprophyte capable de se développer sur de nombreuses sources organiques nutritives : des débris végétaux de feuilles de plantes, fourrage et carcasses d'animaux, insectes morts, grains et graines (maïs, blé, pistaches, arachides, coton, etc.), épices et fruits secs (Klich & Pitt, 1988; Marin et al., 2013). Il est probable que la principale source d'infestation 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 (Shinha and Bhatnagar, 1998). Cependant, *A. flavus* possède

toujours une certaine sélectivité vis-à-vis des denrées alimentaires sur lesquelles il se développe préférentiellement. Ainsi les caractéristiques du substrat ont un impact majeur sur la croissance de ce champignon et la production d'aflatoxines.

D.2.2.1. Effet de la source de carbone

Le glucose, le fructose et le sucrose sont considérés par ordre décroissant comme sources de carbone optimales pour le développement d'*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 toxinogénèse ont lieu sur des substrats contenant du lactose ou 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).

D.2.2.2. Effet de l'azote

L'azote peut être présent sous sa forme organique (extrait de levure, liqueur de maïs macéré, caséine, urée, peptone, etc.) ou inorganique (NaNO_2 , NaNO_3 , NH_4NO_3 , etc.) dans le milieu. C'est en général cette première qui est plus favorable à la fois à la croissance et à la production d'aflatoxines. Par ordre décroissant, les meilleures sources d'azote pour le développement d'*A. flavus* et la production d'aflatoxines sont : liqueur de maïs macéré, extrait de levure, peptone et NaNO_3 (Emara 1997).

D.2.2.3. Effet du pH

Il a été suggéré que la production d'aflatoxines dépend de la perméabilité de la membrane cellulaire fongique, elle-même affectée par le pH du milieu (Emara 1997). Un 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).

D.2.2.4. Effet de l'activité de l'eau

L'activité de l'eau (a_w) est un paramètre clé dans la colonisation fongique d'un substrat. 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, les exigences en a_w peuvent varier et *A. flavus* peut se développer sur des substrats ayant des a_w de 0,78-0,8 (Bhat et al., 2010). Cependant la production d'aflatoxines diminue avec l' a_w et s'arrête complètement quand cette dernière atteint 0,70 (Battilani et al., 2013).

D.2.3. Les facteurs climatiques

D.2.3.1. Effet de la température

La croissance optimale d'*A. flavus* a lieu entre 25 et 37°C, toutefois elle reste possible dans une large gamme s'étalant entre 12 et 48°C. Du point de vue géographique, sa croissance est observée sous des latitudes situées entre 16° et 35°, caractéristiques des zones tropicales et subtropicales, avec un maximum à 45° (Amaike and Keller, 2011; Klich and Pitt, 1988). Les souches d'*A. flavus* les plus fréquemment isolées proviennent surtout des climats chauds, semi-arides ou subtropicaux (Klich, 2007).

D.2.3.2. Effet de l'humidité atmosphérique

Ce champignon est considéré comme semi-thermophile et semi-xérophile (Shinha and 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 supérieures d'humidité (Klich, 2007; Shinha & Bhatnagar, 1998). Comme mentionné précédemment, on distingue deux grandes catégories de contaminants fongiques: les contaminants du champ et ceux du stockage. La température et l'humidité sont les deux paramètres clés influençant le développement des champignons et la production de mycotoxines au cours de ces deux grandes phases de production. Les contaminants du champs requièrent généralement des niveaux d'humidité supérieures (200-250 g/kg) aux contaminants de stockage (130-180 g/kg) (Rodrigues and Naehrer,

2012). Cependant, grâce à sa grande adaptabilité aux conditions environnementales, *A. flavus* peut se développer à la fois sur les cultures aux champs, durant la récolte ainsi qu'au stockage.

De plus, les conditions de sécheresse peuvent 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, dotées d'une activité antimicrobienne empêchant la production d'aflatoxines (Klich, 2007). Sous des conditions de sécheresse prolongée, les grains d'arachides produisent progressivement moins de phytoalexines, et cette production est finalement perdue à une $a_w < 0.95$ (Dorner, 1989).

D.2.3.3. Effet de la teneur en O_2/CO_2

Le développement fongique et la production de mycotoxines ont généralement lieu dans des conditions aérobies. Cependant certaines peuvent présenter un comportement anaérobie facultatif. *A. flavus* peut tolérer jusqu'à 20% de CO_2 (en présence de 0,5 % O_2), mais sans production d'aflatoxines, et sa croissance est inhibée au delà de cette concentration (Taniwaki et al., 2009).

D.2.4. 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 les dommages causés par les insectes qui vont faciliter l'accès du champignon aux nutriments en fragilisant les protections naturelles des grains. Ainsi, la présence de plusieurs insectes tels *Ostrinia nubilalis*, le ver du maïs (Battilani et al., 2013), *Mussidia nigricornis* (foreur des épis de maïs) (Sétamou, 1997), *Sitophilus zeamais* (charançon du maïs) (Laprade, 1977) facilitent l'infection fongique en créant des sites d'entrée pour le champignon et favorisant également la dispersion des spores (Sinha and Sinha, 1990, 1991).

D.3. Voie de biosynthèse des aflatoxines

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 ces enzymes sont donc activés en même temps et placés sous l'influence de régulateurs communs (Yu & Keller, 2005).

Les aflatoxines sont synthétisées à partir d'acétyl-CoA issu du catabolisme de glucose et leur synthèse implique 27 réactions enzymatiques. 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 (**Figure 8**) (Yu & Ehrlich, 2011). Un cluster voisin est retrouvé chez *A. nidulans*, une espèce fongique modèle. Il partage 25 gènes homologues avec celui des aflatoxines et sa cascade enzymatique s'arrête après la production de stérigmatocystine (ST), un précurseur des aflatoxines (Ehrlich, 2009). Ceci explique que de nombreuses études visant la caractérisation du rôle des gènes et de la régulation de ce cluster ont été réalisées chez *A. nidulans*.

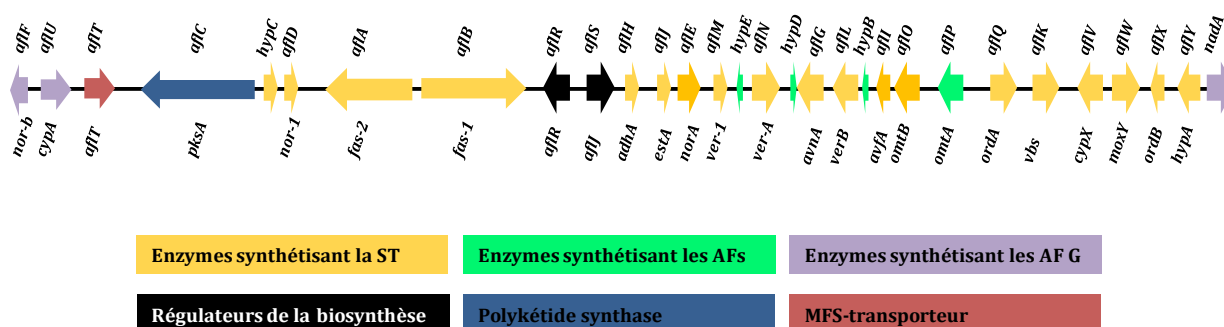


Figure 7. Disposition des 30 gènes du cluster responsable de la biosynthèse des aflatoxines chez *A. flavus*.

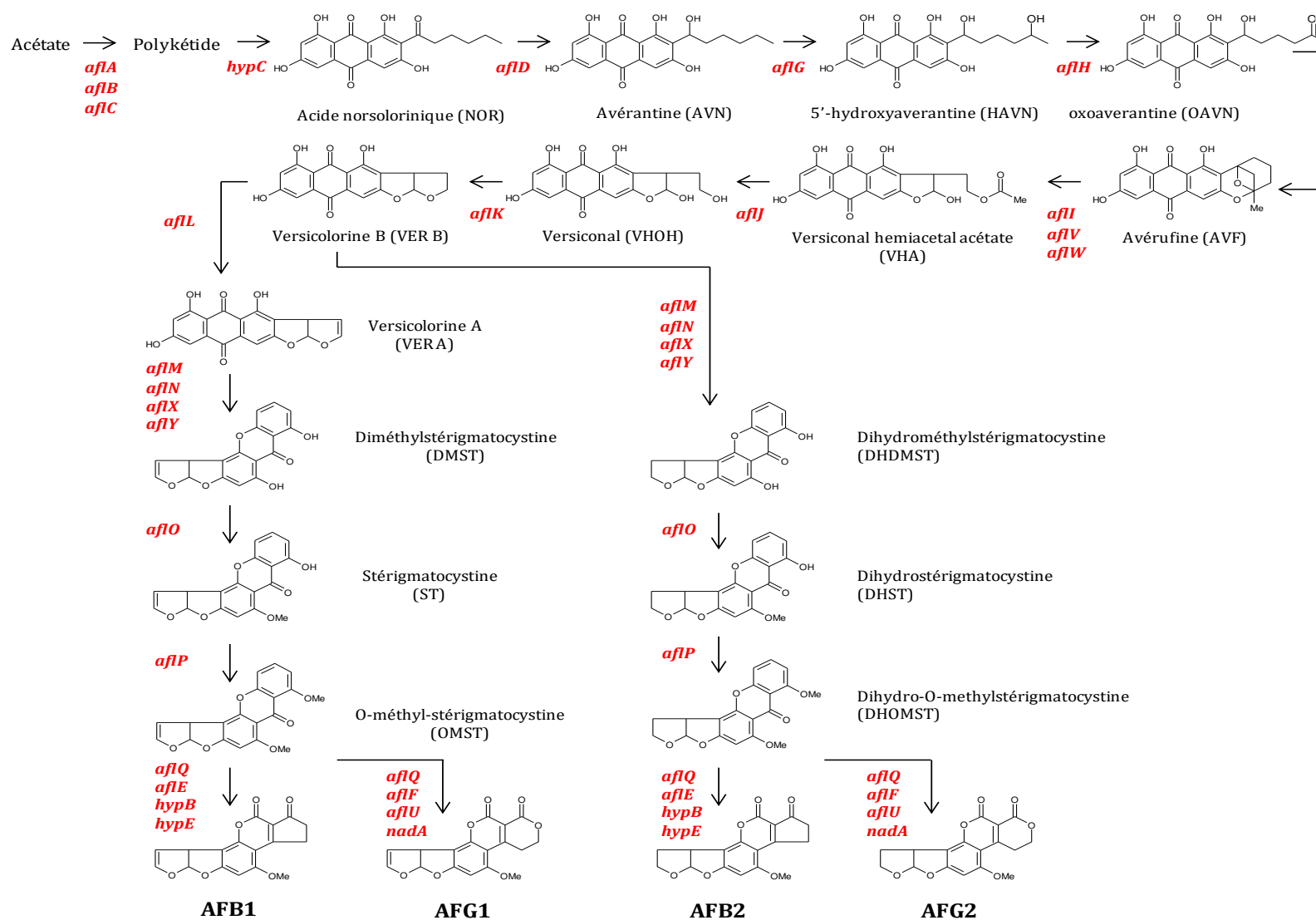


Figure 8. Cascade enzymatique conduisant à la synthèse des aflatoxines B1, B2 G1 et G2 et représentation des gènes du cluster codant les enzymes intervenant dans chacune des conversions.

L'élucidation du cluster de gènes de la voie de biosynthèse des aflatoxines et la caractérisation des rôles respectifs des enzymes qu'ils encodent a été possible en utilisant essentiellement des techniques de clonage et de mutagenèse dirigée. On a ainsi produit des souches mutantes d'*A. parasiticus* et *A. flavus* ou d'*A. nidulans*, chez lesquelles on a pu caractériser, en fonction des mutations, la nature des intermédiaires métaboliques accumulés (Brown et al., 1999). La connaissance de ce cluster repose aussi sur les techniques de séquençages transcriptomiques (EST) (Yu, 2004). Le cluster des aflatoxines ainsi que celui de la ST sont toujours les plus étudiés après celui de la pénicilline (Yu & Keller, 2005).

Les gènes codant les enzymes responsables des différentes étapes de la synthèse ont donc été séquencés et identifiés chez *A. flavus* (Bhatnagar et al., 2008; Ehrlich, 2007, 2009) et *A. parasiticus* (Roze, 2014) et ont été associés à des réactions enzymatiques de la cascade aboutissant à la production des différentes aflatoxines (**Figure 9**). Les étapes principales de la voie des aflatoxines ont été décrites dans les publications de Ehrlich, 2009; Yu and Ehrlich, 2011; Yu, 2012 et se résument comme suit :

Étape 1. Conversion de l'acétate en acide norsolorinique

L'acide norsolorinique (NOR) est considéré comme le premier précurseur stable des aflatoxines. Sa formation nécessite la condensation d'un groupement d'acétate (acétyl-CoA) avec 7 groupements malonyl. Les enzymes impliquées dans cette réaction sont deux acide gras synthases (FAS ou « fatty acid synthase »), Fas-1 et Fas-2 codées par *aflA* et *aflB* respectivement, et une polykétide synthase (PksA) codée par *aflC*. Les FAS et les PKS peuvent partager des domaines catalytiques similaires mais produisent des molécules de structures différentes (Brown et al., 1999). Les premières extensions sont prises en charge par des FAS et aboutissent à la formation d'un acide hexanoïque (ou hexanoyl acétyl-CoA). Ce dernier est reconnu par le domaine AT (acyl transférase) de la PksA et sera à son tour pris en charge par les domaines catalytiques de cette enzyme : l'AC (protéine transporteur d'acyle), la KS (kétosynthase), la MAT (malonyl-CoA :AC transacyclase) et finalement une TE/CLC (thioesterase/Claisen-like cyclase), pour former le noranthrone (Crawford et al., 2008). Le noranthrone est par la suite transformé en acide norsolorinique par le biais d'une

anthrone oxydase codée par le gène *hypC* (Figure 10).

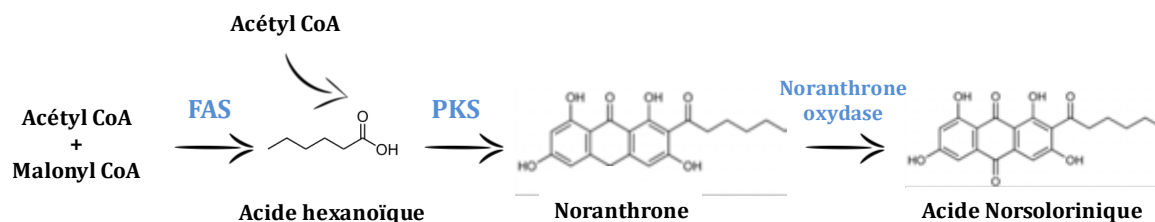


Figure 9. Formation de l'acide norsolorinique (NOR), premier précurseur stable des aflatoxines à partir de la condensation de groupements acétyl- et malonyl-CoA

Étape 2. Conversion de NOR en avérintine (AVN)

Suite à une complémentation génétique, le gène *aflD* (*nor-1*), codant pour une kétéroréductase, a été cloné chez *Escherichia coli*. Cette enzyme catalyse la transformation du NOR en AVN par réduction du groupement carbonyle en hydroxyle. Le gène *aflD* possède également deux autres homologues dans le cluster, *aflF* et *aflE*, codant pour des déshydrogénases qui pourraient catalyser le NOR en AVN. Ceci pourrait expliquer que les mutants d'*A. parasiticus* délétés pour cette enzyme et accumulant le NOR continuent à produire des aflatoxines : ils sont qualifiés de « leaky » (= fuyant).

Étape 3. Conversion de l'AVN en avérufine (AVF)

La transformation de l'AVN à l'AVF implique un passage par plusieurs intermédiaires : i) oxydation de l'AVN en 5'hydroxyavérintine (HAVN) par une P-450 mono-oxygénase codée par le gène *aflG* (*avnA*) ; ii) conversion de l'HAVN en oxo-avérintine (OAVN) par une alcool déshydrogénase codée par *aflH* (*adhA*) et puis de l'OAVN à l'AVF par la même enzyme. Cependant la mutation du gène *aflH* est aussi qualifiée de « leaky » et il a été proposé que d'autres enzymes cytosoliques puissent indirectement catalyser le passage de l'HAVN à l'AVF en passant par un autre métabolite instable l'avérufanine (AVNN).

Étape 4. Oxydation de l'AVF en hémicétal acétate versiconal (VHA)

Cette réaction est principalement catalysée par deux mono-oxygénases nécessitant la présence de NADPH et passe par deux étapes. La première permet le passage de l'AVF en

hydroxy-versicolorone (HVN) et implique une cytochrome P-450 mono-oxygénase microsomale (CypX) codée par *afIV*, et AvfA, une oxydoréductase flavine-dépendante avec une fonction catalytique inconnue codée par *afII*. Les mutants de ces deux gènes accumulent l'AVF sans autres intermédiaires. Il a été proposé qu'AvfA forme un complexe avec CypX pour faciliter le transfert d'ions nécessaire à la formation du groupement cyclique chez HVN. La deuxième oxydation a lieu à travers une mono-oxygénase cytosolique MoxY, codée par *afIW* et qui aboutit à la formation du VHA (Wen et al., 2005).

Étape 5. Passage de VHA à la versicolorine B (VERB)

Deux étapes sont nécessaires pour aboutir à la VERB : i) une hydrolyse catalysée par une estérase codée par *afIJ* entraînant la formation de versiconal (VHOH) ; ii) la fermeture du cycle bifurane, responsable de la toxicité des aflatoxines, par une cyclase, codée par *afIK*.

Étape 6. De la VERB à la versicolorine A (VERA)

La formation de VERB constitue un branchement critique de la voie de biosynthèse des aflatoxines puisqu'elle peut aboutir soit à la formation d'AFB1/AFG1 ou d'AFB2/AFG2. La formation d'AFB1/AFG1 nécessite la saturation du cycle bifurane formé et donc le passage par la VERA. Cette réaction est catalysée par une désaturase instable, nécessitant la présence de NADPH, codée par *afIL*.

Étape 7. Conversion de VERA en diméthylstérigmatocystine (DMST) et de VERB en dihydrométhylstérigmatocystine (DHDMST)

VERA ou VERB sont transformés par une P-450 mono-oxygénase (*afIN*) permettant le passage à des intermédiaires instables pris ensuite en charge par une kétoréductase Ver-1 (*afIM*), similaire à Nor-1, afin de former le DMST ou le DHDMST respectivement. Ces réactions nécessitent aussi la présence d'une troisième enzyme, Baeyer-Villiger mono-oxygénase, codée par *afIY* (*hypA*). Une autre enzyme Ord-B (*afIX*) pourrait également agir, comme son homologue AvfA, pour faciliter cette conversion.

Étape 8. Conversion de DMST en ST et de DHDMST en dihydrostérigmatocystine (DHST)

L'ajout d'un groupement méthyl à DMST ou DHDMST se fait par une O-méthyl-transférase (I) nommée OmtB et codée par ***aflO***.

Étape 9. Conversion de ST en O-méthylstérigmatocystine (OMST) et de DHST en Dihydro-O-méthylstérigmatocystine (DHOMST)

L'ajout d'un autre groupement methyl se fait par la deuxième O-méthyl-transférase (II) de cette cascade codée par ***aflP***. L'absence de l'orthologue de ce gène chez *A. nidulans* explique l'arrêt de la cascade au niveau de la stérigmatocystine.

Étape 10. Conversion d'OMST en AFB1 et AFG1 et de la DHOMST en AFB2 et AFG2

Une cytochrome P-450 mono-oxygénase, Ord-1 ou Ord-A (***aflQ***) est nécessaire pour la conversion de OMST en AFB1 et AFG1 et de la DHOMST en AFB2 et AFG2 chez *A. flavus* et *A. parasiticus*. HypB (***hypB***) pourrait intervenir dans l'oxydation de 11-hydroxyOMST (HOMST), produit initial d'OrdA et précurseur de l'AFB1. Le clonage et la caractérisation d'un autre gène ***aflU*** (*cypA*) a démontré qu'il code pour une autre enzyme cytochrome P-450 mono-oxygénase, essentielle pour la production des aflatoxines G. ***aflU***, ainsi qu'un autre gène, ***aflF***, sont présents en séquence complète chez *A. parasiticus* et contribuent à la capacité de ce dernier à produire les aflatoxines B et G. Par contre, chez *A. flavus*, les séquences de ces gènes présentent des mutations au niveau de la région 5' ce qui explique l'incapacité de cette espèce à produire les aflatoxines G (Ehrlich et al., 2004). Il a également été démontré que ***nadA*** contribue à la formation d'un composé intermédiaire NADA, situé entre l'OMST et l'AFG1 (Cai et al., 2008).

L'étude de Ehrlich (2009) propose également la contribution de ***hypE*** et ***aflE*** dans les dernières étapes de la formation de l'AFB1. HypE présente des homologies avec des enzymes bactériennes possédant des domaines ethD (dégradation des éthers) qui interagissent avec des cytochromes P-450.

Quant au gène ***hypD***, sa mutation entraîne une réduction de la production d'AFB1 et d'AFG1 chez *A. parasiticus* ainsi qu'une augmentation de la sporulation. Ce gène code une

protéine membranaire qui présente des homologies avec des transporteurs. Il a été également démontré que le gène *aflT* du cluster, appartenant à la grande famille de MFS-transporteurs (Major Facilitator Superfamily) ne joue aucun rôle dans la biosynthèse ou dans le transport des aflatoxines (Chang et al., 2004). L'expression de ce gène a été liée à la voie de signalisation FadA-dépendante des protéines-G. Il a donc été suggéré que HypD pourrait jouer le rôle d'une perméase permettant le transport extracellulaire des aflatoxines. En effet, les intermédiaires, les substrats ainsi que les enzymes des voies biosynthétiques des métabolites secondaires sont en général distribués sur plusieurs localisations sub-cellulaires (vacuole, peroxisome, cytoplasme). Des études chez *A. parasiticus* ont démontré que la voie de biosynthèse des aflatoxines est compartimentée et certaines enzymes sont localisées dans des vésicules dites « aflatoxisomes » qui jouent également un rôle dans l'exocytose des aflatoxines. Les aflatoxisomes sont transportés au niveau de la membrane plasmique et leur contenu pourrait être expulsé selon 3 mécanismes possibles: i) les aflatoxisomes sont entièrement transportés traversant la barrière plasmique ; ii) les aflatoxisomes fusionnent avec la membrane plasmique et des protéines trans-membranaires agissent comme médiateurs pour expulser leur contenu dans le milieu extracellulaire ; iii) une protubérance des aflatoxisomes se crée au niveau de la membrane plasmique afin d'expulser leur contenu (Chanda et al., 2010, 2009a, 2009b; Roze et al., 2011).

D.4. Régulation du cluster des aflatoxines

Comme pour la synthèse de tout métabolite secondaire, la régulation du cluster des aflatoxines fait intervenir un certain nombre de facteurs agissant pour son activation ou sa répression. La régulation peut avoir lieu à travers des facteurs internes appartenant au cluster ou bien par des facteurs externes. La plupart des clusters de métabolites secondaires possèdent des Facteurs de Transcriptions (FT) qui agissent directement sur le reste des gènes. L'expression de ces régulateurs internes dépend également d'autres FT plus globaux, eux même sous le contrôle de différents stimuli physiologiques et/ou environnementaux.

D.4.1. Les facteurs de transcription appartenant au cluster

Le facteur de transcription AflR

Le gène *aflR* code pour un FT à doigts de zinc (Cys₆Zn₂) de type Gal4, AflR. Celui-ci se fixe au niveau des régions promotrices des gènes structuraux du cluster pour initier leur transcription. La présence d'AflR est essentielle pour l'expression des gènes du cluster des aflatoxines chez *A. flavus* et *A. parasiticus* ainsi que pour celui de la ST chez *A. nidulans*. Les séquences d'*aflR* chez *A. flavus* et *A. parasiticus* partagent 95% de similarité. Tandis que le gène *aflR* chez *A. nidulans* n'a que 33% d'identité avec celui d'*A. flavus* et *A. parasiticus*. Toutefois, cette similarité passe à 71% au niveau de la région codant pour le site de doigts de zinc qui se fixe sur l'ADN. Celle-ci est également élevée dans la région codant pour l'extrémité C-terminale du gène *aflR* chez ces trois espèces (Payne & Brown, 1998). La fonction d'AflR est conservée chez *A. nidulans* et *A. flavus* : une induction de l'expression d'un *aflR* d'*A. flavus* chez *A. nidulans* dans des conditions répressives pour la synthèse de ST a permis de restaurer la production de ST (Yu et al., 1996). Par ailleurs, chez *A. flavus*, la surexpression d'*aflR* induite par l'insertion du promoteur de *gpdA*, a entraîné la production de 50 fois plus d'aflatoxines, en lien avec une surexpression des gènes du cluster (Flaherty and Payne, 1997). Par ailleurs, il a été également montré qu'*aflR* régule l'expression de deux autres gènes (*hlyC* et *niiA*) n'appartenant pas au cluster des aflatoxines (Price et al., 2006).

La liaison d'AflR sur les régions promotrices des gènes des clusters d'AF et ST se fait par reconnaissance d'une séquence palindromique (5'-TCGN₅CGR-3') généralement localisée à -80 à -600 pb du codon « start » des gènes structuraux d'*A. nidulans* et *A. flavus*. Toutefois, la plupart, mais pas tous, des motifs sont reconnus par les souches d'*A. parasiticus* (K. C. Ehrlich et al., 1999). Une deuxième séquence de liaison (5'-TTAGGCCTAA) a été trouvée chez *A. flavus* et *A. parasiticus* mais pas chez *A. nidulans* (Payne & Brown, 1998). Cette séquence est encore présente sur la région promotrice d'*aflR* (-102 à -115 pb du codon start) et sa troncation réduit l'activité de ce facteur de moitié. Cela indique qu'*aflR* est capable de s'autoréguler (Chang et al., 1995).

Le co-activateur AflS

AflS est une protéine spécifiquement fongique qui ne possède pas de domaines de fixation à l'ADN mais peut interagir avec AflR et constitue donc son co-activateur. La disruption du gène *aflS* entraîne l'arrêt de la production d'aflatoxines et de ses intermédiaires ainsi qu'une répression des gènes du cluster. Cependant cette disruption n'affecte pas celle d'*aflR* et *vice versa*. La régulation de ces deux gènes est donc indépendante l'une de l'autre (Chang, 2003). AflS possède trois domaines transmembranaires et une séquence signal ciblant les extrémités C-terminale. Il est admis que cette protéine est membranaire et n'interagit pas au niveau transcriptomique avec les gènes du cluster (Wilkinson et al., 2011). La régulation par AflS a lieu grâce à son interaction avec AflR et la formation d'un complexe facilitant la liaison de ce dernier aux sites de fixation se situant sur les régions promotrices des gènes structuraux.

La formation du complexe AflR/AflS

AflS interagit avec AflR au niveau du milieu et de l'extrémité C-terminale de sa séquence protéique. L'intégrité de la séquence d'AflR et en particulier la présence des trois acides aminés Arg427, Arg429 and Arg431 au niveau de son extrémité C-terminale est essentielle pour son interaction avec AflS (Chang, 2003). L'incapacité d'*A. sojae* à produire les aflatoxines est essentiellement due à la présence d'une mutation ponctuelle au niveau du gène *aflR* induisant la troncation du domaine d'activation de transcription d'AflR et inhibant également son interaction avec AflS (Chang et al., 2007; Takahashi et al., 2002). L'étude de Kong et al. (2014), a suggéré une association de 4 protéines AflS à 1 protéine AflR pour la formation du complexe AflR/AflS, facilitant la liaison d'AflR au niveau des régions promotrices des gènes du cluster et l'induction de leur transcription (**Figure 11**).

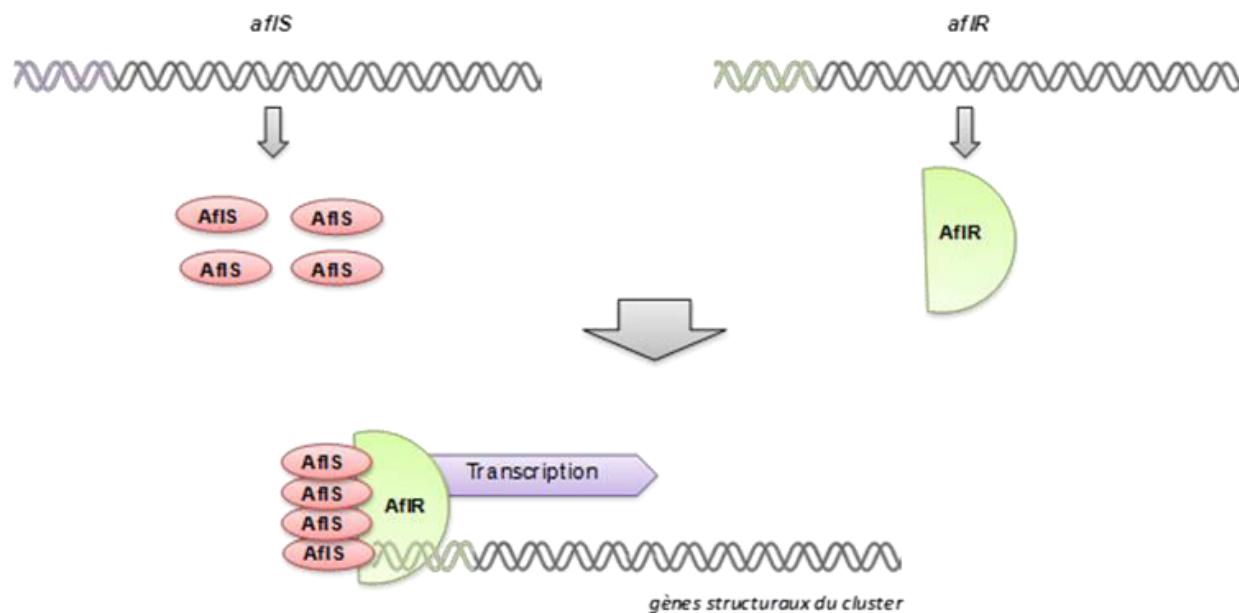


Figure 10. Schéma hypothétique de l'interaction entre AflR et AflS pour l'activation du cluster des aflatoxines

Un tel complexe existe aussi chez d'autres espèces et est impliqué dans d'autres voies de biosynthèse telle que l'endocrocine chez *A. fumigatus* nécessitant la présence des deux gènes *tpcC* et *enca* (Throckmorton et al., 2016), la monodictiphénone dont la synthèse est régulée par *mdpH* (homologue à *aflR*) et son co-activateur *mdpA* (homologue à *aflS*) chez *A. nidulans* (Chiang et al., 2010), et l'acide pesthéïque dont la synthèse est régulée par trois gènes, *ptaR1* (homologue à *aflR*), *ptaR2* (homologue à *aflS*) et *ptaR3* chez *Pestalotiopsis fici* (Xu et al., 2014).

D.4.2. Régulation par des facteurs externes

Le cluster des aflatoxines est aussi gouverné, à un niveau supérieur, par des facteurs de transcription globaux activés en réponse à différents stimuli externes. Ces facteurs peuvent être des régulateurs du développement, des FT globaux régulant le métabolisme secondaire, des FT dépendants de changements environnementaux (pH, azote, carbone, lumière, stress oxydatif) ou bien impliqués dans différentes voies de signalisation cellulaire. La complexité de la régulation du métabolisme secondaire en général et de la

synthèse des aflatoxines en particulier est principalement due à la grande variabilité de ces facteurs ainsi qu'à leur interdépendance (**Figure 12**).

Ces facteurs peuvent moduler l'activation du cluster en régulant l'expression d'*aflR*. Certains peuvent également agir directement sur quelques gènes du cluster. C'est par exemple le cas de *nsdC*. La délétion de ce gène chez *A. flavus* n'a pas modulé l'expression d'*aflR* mais inhibe cependant l'expression d'autres gènes du cluster (*aflC*, *aflD*, *aflM* et *aflP*) ainsi que la production de l'aflatoxine B1 (Cary et al., 2012).

Les relations entre les différents régulateurs de la voie de synthèse des aflatoxines ont été établies par génération de mutants de ces gènes chez *A. flavus*, *A. parasiticus* et l'étude transcriptomique de l'expression d'*aflR* en association avec la production d'aflatoxines dans le milieu. Toutefois, un grand nombre d'études a aussi été menée chez *A. nidulans*, espèce modèle pour les études sur les *Aspergillus sp.*. Ces études caractérisent l'effet de ces facteurs sur l'homologue d'*aflR* (*stcU*) chez cette espèce ainsi que sur la production de ST, précurseur des aflatoxines (Shimizu et al., 2003) (**Tableau 6, Figure 9**). Bien qu'il existe de nombreuses homologies entre la production de ST et celle d'AF, les modulations ayant lieu chez *A. nidulans* ne peuvent pas toujours être extrapolées chez *A. flavus* et *A. parasiticus*. Par exemple, la délétion du gène *fluG*, impliqué dans le développement et la conidiogenèse, entraîne une inhibition de la production de ST chez *A. nidulans* alors qu'un mutant *fluG* d'*A. flavus* conserve toujours sa capacité à produire l'aflatoxine (Chang et al., 2012c). Il est donc nécessaire d'analyser et comprendre ces mécanismes de régulation directement chez les espèces productrices d'aflatoxines et notamment chez *A. flavus* afin de pouvoir identifier les facteurs environnementaux et les voies de signalisation cellulaires en lien avec la production d'aflatoxines et permettre, le cas échéant, de cibler ces voies pour inhiber la synthèse de toxine et limiter la contamination des aliments.

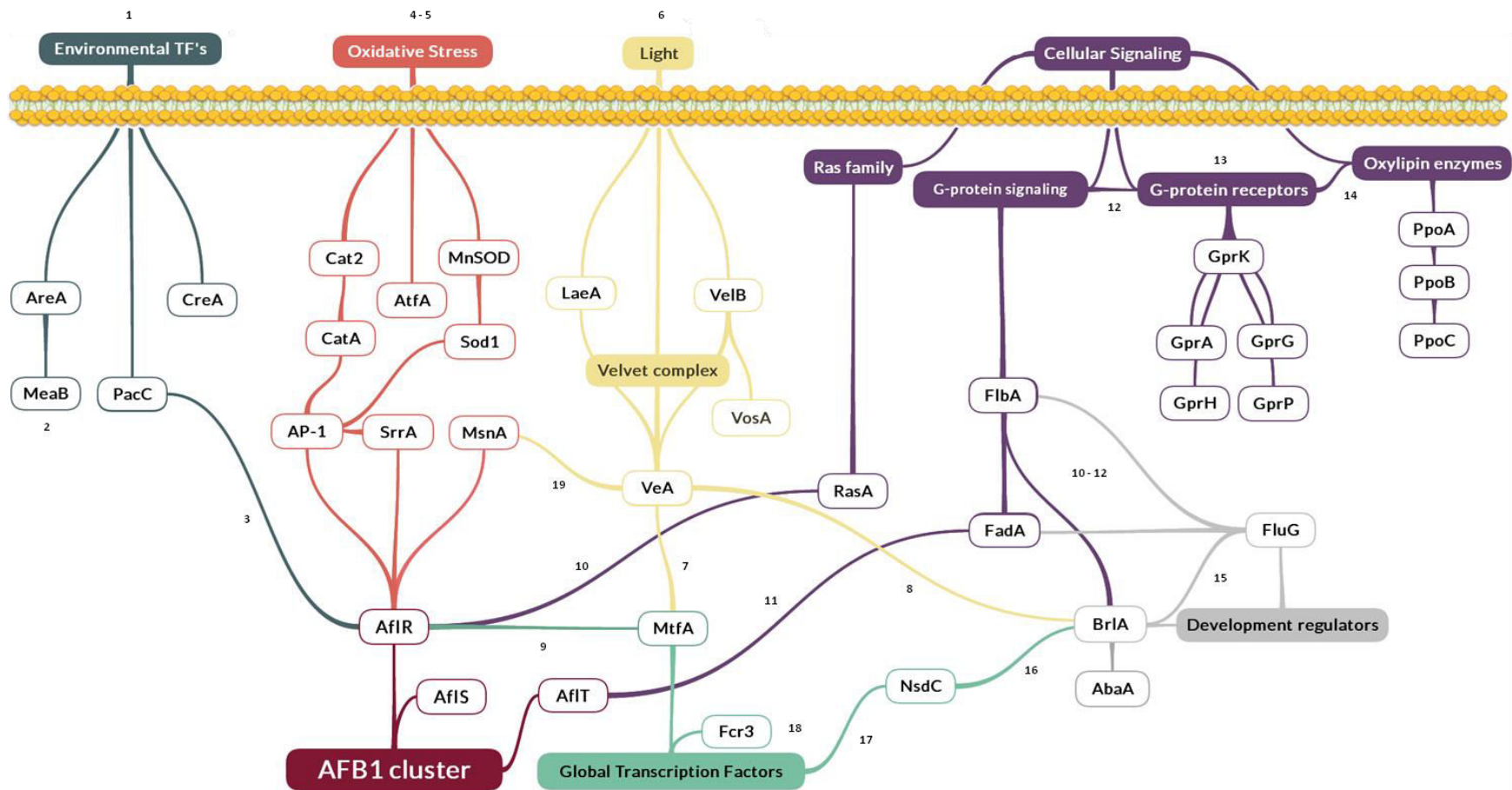


Figure 11. Schéma hypothétique simplifiant les interactions entre différentes familles de facteurs régulateurs d'AflR et AfIS. Ces interactions sont issues des études suivantes: 1. Yu and Keller, (2005); 2. Yin and Keller, (2011); 3. Ehrlich et al. (1999); 4. Hong et al., (2013); 5. Montibus et al., (2013); 6. Bayram and Braus, (2012); 7. Lind et al., (2015); 8. Kato et al., (2003); 9. Ramamoorthy et al., (2013); 10. Shimizu et al., (2003); 11. Chang et al., (2004) ; 12. Hicks et al., (1997) ; 13. Affeldt et al., (2014); 14 Affeldt et al., (2012); 15. Adams et al., (1992); 16. Cary et al., (2012) ; 17. Gilbert et al., (2015) ; 18. Shaaban et al., (2010).

Table 6. Influence des différents facteurs environnementaux sur la production d'AF/ST et l'expression d'*aflR* chez *A. nidulans*, *A. flavus* et *A. parasiticus*.

Famille	Type	Gène chez <i>A. flavus</i>	Activation ou régulation	Type de manipulation chez <i>A.n.</i> , <i>A.f.</i> ou <i>A.p.</i>	Impact du mutant sur la production d'AF/ST	Impact sur l'expression d' <i>aflR</i>	Mécanisme d'action	Références
Facteurs de transcription (FT) environnementaux	FT GATA	<i>areA</i>	Stimuli: concentration en azote	Clonage et analyse séquentielle (<i>A.p.</i>), Δ <i>areA</i> (<i>A.n.</i>)	↘ AF	↘ <i>aflR</i> et <i>aflS</i>	Site de liaison GATA sur la région intergénique <i>aflR/aflS</i> (<i>A.p.</i>)	Chang et al. (2000, 1995)
	FT bZIP	<i>meaB</i>		OE:: <i>meaB</i> (<i>A.f.</i>) Δ <i>meaB</i> (<i>A.f.</i>)	↗ AF ↘ AF	Nd Nd	nd nd	Amaike et al. (2013)
	FTdoigts de Zn (Type Cis ₂ Hys ₂)	<i>creA</i>	Stimuli: concentration en carbone	Analyse séquentielle (<i>A.f.</i>)	nd	Nd	Inhibition du catabolisme de carbone. Site de liaison sur la région promotrice d' <i>aflC</i>	Ehrlich et al. (2002)
	FT doigts de Zn (type Cys ₂ His ₂)	<i>pacC</i>	Stimuli: pH	<i>pacC</i> ^{Cc202} (activation, <i>A.n.</i>)	10x ↘ ST	↘ <i>aflR</i>	Site de liaison PacC sur le promoteur d' <i>aflR</i> (<i>A.f.</i>)	Ehrlich et al. (1999)
Stress oxydatif	FT doigts de Zn (type Cys ₂ His ₂)	<i>msnA</i>		Δ <i>msnA</i> (<i>A.p.</i>)	↗ AF	Nd	MsnA, AtfB et SrrA (recrute AP-1) se fixent sur leurs sites de liaison respectifs (STRE, CRE, SRRRA et AP1) pour assister AflR dans l'induction des gènes du cluster	Chang et al. (2011); Hong et al. (2013b)
	FT bZIP	<i>srrA</i>		Analyse séquentielle (<i>A.p.</i>)	↗ AF	Nd		Hong et al. (2013b)
	FT bZIP	<i>atfB</i>		Analyse séquentielle (<i>A.p.</i>)	↗ AF	Nd		Roze et al. (2011)
	FT bZIP	<i>ap-1</i>		Δ <i>ap-1</i> (<i>A.p.</i>)	↗ AF	Nd		Hong et al. (2013a)
	Superoxyde dismutases	<i>sod1</i>	Activés par MsnA, SrrA,	Analyse séquentielle (<i>A.p.</i>)	nd	nd	Cytoplasme: catalyse des	Hong et al. (2013a et b) ; Montibus et al. (2013)

		AtfB et AP1. Caractérisés chez <i>A.f.</i> plutôt au niveau enzymatique				superoxydes		
		<i>mnsod</i>	$\Delta mnsod$ (<i>A.f.</i>)	↘ AF	Nd	Mitochondrie: catalyse des peroxydes	He et al.(2007; Narasaiah et al. (2006)	
Catalases		<i>catA</i>	Analyse séquentielle (<i>A.p.</i>)	nd	Nd	catalyse du peroxyde d'hydrogene	Hong et al. (2013a et b) ; Montibus et al., 2013	
		<i>cat2</i>	Analyse séquentielle (<i>A.p.</i>)	nd	Nd			
Complexe velvet		<i>veA</i>	ΔveA (<i>A.f.</i>)	↘ AF	↘ <i>aflR</i>		Duran et al. (2007)	
		<i>laeA</i>	$\Delta laeA$ (<i>A.f.</i>)	↘ AF	↘ <i>aflR</i> nc en absence de <i>veA</i>		Chang et al., (2012b)	
		<i>velB</i>	$\Delta laeA$ (<i>A.f.</i> CA14)	↘ AF			Chang et al. (2013)	
		<i>vosA</i>	$\Delta laeA$ (<i>A.n.</i>)	nd	Nd	Inhibition de <i>brlA</i>	Ni and Yu (2007)	
FT globaux	FTdoigts de zinc (type C ₂ H ₂)	<i>mtfA</i>	$\Delta mtfA$ (<i>A.f.</i>) et OE:: <i>mtfA</i> (<i>A.f.</i>)	↘ AF dans les 2 cas	↘ <i>aflR</i> dans les 2 cas	nd	Zhuang et al. (2016)	
	FT bZIP	<i>fcr3</i>	OE:: <i>rsmA</i> (ΔveA et $\Delta laeA$, <i>A.n.</i>) OE:: <i>rsmA</i> $\Delta rsmA$	Restauration de la production de ST ↗ ST nc	Restauratio n de l'expression d' <i>aflR</i> ↗ <i>aflR</i> Nc	nd	Shaaban et al. (2010)	
	RNA- polymerase II TF-like	<i>rtfA</i>	$\Delta rsmA$ (<i>A.f.</i>)	↘ AF	Nd	Régulation de VeA et LaeA	Lohmar et al. (2016)	
Développement		<i>abaA</i>	Activé par BrlA	Analyse séquentielle (<i>A.f.</i> et <i>A.p.</i>)	nd	Nd	Site de liaison AbaA sur la région intergénique <i>aflR/aflS</i> (<i>A.f.</i> et <i>A.p.</i>)	Ehrlich et al. (2003)
	FT doigts de Zn (type C ₂ H ₂)	<i>brlA</i>	Activé par FlbA	Analyse séquentielle (<i>A.f.</i> et <i>A.p.</i>) et $\Delta brlA$ (<i>A.n.</i>)	"nc" chez <i>A.n.</i> et "nd" chez <i>A.f.</i> et <i>A.p.</i>	"nc" chez <i>A.n.</i> et "nd" chez <i>A.f.</i> et <i>A.p.</i>	Site de liaison BrlA sur la région intergénique <i>aflR/aflS</i> (<i>A.f.</i> et <i>A.p.</i>)	Ehrlich et al. (2003); Hicks et al. (1997)

	<i>fluG</i>		$\Delta fluG$ (A.n.)	\searrow ST	\searrow <i>aflR</i>	Interagit avec le complexe velvet (A.f.)	Hicks et al. (1997)
		Réprimés par FadA (A.n.)	OE:: <i>fluG</i> (A.n.)	\nearrow ST	\nearrow <i>aflR</i>		Chang et al. (2013)
			$\Delta fluG$ (A.f.)	nc	Nd		Chang et al. (2012c)
	<i>flbA</i>		$\Delta flbA$ (A.n.)	\searrow ST	\searrow <i>aflR</i>		Hicks et al. (1997)
			OE:: <i>flbA</i> (A.n.)	\nearrow ST	\nearrow <i>aflR</i>		
FT doigts de zinc (type C ₂ H ₂)	<i>nsdC</i>		$\Delta nsdC$ (A.f.)	\searrow AF	nc pour <i>aflR</i> mais \searrow de: <i>aflC</i> , <i>aflD</i> , <i>aflM</i> et <i>aflP</i>	Possible modulation indirecte d' <i>aflR</i>	Cary et al, (2012); Gilbert et al., (2015)
Signalisation cellulaire	Voie des protéines G	<i>fadA</i>	Activation du développement et de la conidiation <i>fadA</i> ^{GA2R} , allèle activé (A.p. TJYP1-22)	\searrow AF	\searrow <i>aflR</i> chez A.n.	Répression d' <i>AflR</i> en activant des protéines kinases PkaA	Roze et al, (2004)
	Récepteurs aux protéines G	<i>gprA</i>	$\Delta gprA$ (A.f.)	1,5x \nearrow AF	Nd	nd	
		<i>gprG</i>	$\Delta gprG$ (A.f.)	nc	Nd	nd	
		<i>gprH</i>	$\Delta gprH$ (A.f.)	nc	Nd	nd	Affeldt et al., (2012)
		<i>gprK</i>	$\Delta gprK$ (A.f.)	nc	Nd	nd	
		<i>gprP</i>	$\Delta gprP$ (A.f.)	2,3x \nearrow AF	Nd	nd	
	Famille Ras	<i>rasA</i>	Dépend de PkaA <i>rasAG17V</i> allèle activé (A.n. RKIS13.7)	\searrow ST	\searrow <i>aflR</i>	Répression transcriptionnelle et post-transcriptionnelle	Shimizu et al. (2003)
	Oxylipines	<i>ppoA</i>	$\Delta ppoA$ (A.f.)	\nearrow AF	Nd		
		<i>ppoB</i>	Régulation dépend de VeA $\Delta ppoA/\Delta ppoB/\Delta ppoC$ (A.f.)	\nearrow AF	Nd	Réduction de l'activité des lipases	Brown and Scott, (2009); Tsitsigiannis and Keller, (2006)
		<i>ppoC</i>	$\Delta ppoC$ (A.f.)	\nearrow AF	Nd		
		<i>ppoD</i>	$\Delta ppoD$ (A.f.)	\nearrow AF	Nd		
		<i>lox</i>	Δlox (A.f.)	nc	Nd		

Abréviations: nd = non définie; nc = pas de changement ; A.n. = *A. nidulans* ; A.f. = *A.flavus* ; A.p. = *A. parasiticus* ; \searrow = modulation négative ; \nearrow = modulation positive

D.4.3. Régulation de la voie de biosynthèse des aflatoxines et stress oxydatif

Lorsqu'ils sont exposés à un stress oxydatif environnemental, les champignons activent plusieurs lignes de défense afin de se protéger contre les dommages cellulaires que peuvent induire l'apparition de ROS (espèces réactives de l'oxygène). Il a été suggéré que la première ligne de défense est représentée par l'activation d'enzymes anti-oxydantes (catalases (CAT), superoxyde dismutases (SOD), peroxydases). Les SOD et les CAT sont les enzymes anti-oxydantes majeures :

- Les SOD catalysent la transformation du superoxyde en peroxyde (H_2O_2)
- Les CAT détoxifient H_2O_2 en H_2O et O_2 (Hong et al., 2013b).

Les cellules déficientes en *sod1* (codant une Cu/ZnSOD cytoplasmique), sont plus sensibles aux agents perturbant la paroi cellulaire et accumulent plus de ROS (Montibus et al., 2013). Une modulation de l'activité des SOD et des CAT a été directement associée à un changement des niveaux de ROS mais aussi à une modulation de la production d'aflatoxines chez *A. flavus* (Grintzalis et al., 2014).

De plus, il a été démontré que la production d'aflatoxines est induite par une augmentation du stress oxydatif (ROS) chez *A. flavus* et *A. parasiticus* et que les souches aflatoxinogènes exigent des taux supérieurs d'oxygène par rapport aux souches non aflatoxinogènes (Jayashree and Subramanyam, 2000).

Au niveau cellulaire, le stress oxydant est géré par des FT qui peuvent être groupés en plusieurs familles selon la structure de leur domaine de liaison à l'ADN (bZIP ou « basic leucine zipper », doigts de zinc, etc.) qui détermine les sites reconnus pour leur fixation. Les FT connus pour leur intervention dans les mécanismes impliqués dans le stress oxydatif sont : AtfA, AtfB, AP-1, SrrA et MsnA.

Des études menées sur des mutants délétés pour les gènes codant ces FT montrent une accumulation de ROS et une augmentation de la production d'aflatoxines (ou production précoce) en comparaison aux souches sauvages. C'est par exemple le cas des souches $\Delta msnA$ chez *A. parasiticus* et *A. flavus* (Chang et al., 2011) et $\Delta ap-1$ chez *A. parasiticus* (Reverberi et al., 2007).

Ces FT peuvent moduler l'expression des gènes de la voie de biosynthèse des aflatoxines (*aflA*, *aflB*, *aflD*, *aflE*, *aflM*, *aflP*, *aflQ*) intervenant à différents stades de la cascade, ainsi que celle des gènes codant des SOD (*sod1* et *mnsod*) et des CAT (*catA* et *cat2*) (Hong et al., 2013a). Par exemple, AtfB est capable de se fixer sur les sites de liaison CRE-1 (5'-TGACATAA-3') et AP-1 (5'-TGAGTAC-3') de la région promotrice d'*aflD* (*nor-1*), intervenant dans les étapes précoces de la cascade enzymatique de synthèse des aflatoxines ainsi que sur des sites CRE (5'-TGACGTCA-3') de la région promotrice de 6 autres gènes de cette voie de biosynthèse mais aussi de *mnsod* et *catA* (Hong et al., 2013b). MsnA se fixe sur des sites STRE (« **ST**ress **R**esponse **E**lement » (5'-CCCCT-3')) des promoteurs des gènes cités ci-dessus et de *mnsod* (codant pour une SOD mitochondriale). AP-1 possède un site de fixation (5'-TGACTAC-3') sur la région promotrice d'*aflR* induisant l'activation de ce dernier (Reverberi et al., 2010).

Il convient de signaler que les sites de fixation de ces FT se situent à proximité des régions promotrices des gènes qu'ils modulent et sont à 500 pb du codon d'initialisation de la transcription (Roze et al., 2013). Ces FT (AtfB, AP-1, MsnA et SrrA) peuvent interagir par association physique avec AflR et participer à la co-régulation de l'expression de ces gènes de la voie de biosynthèse (**Figure 13**).

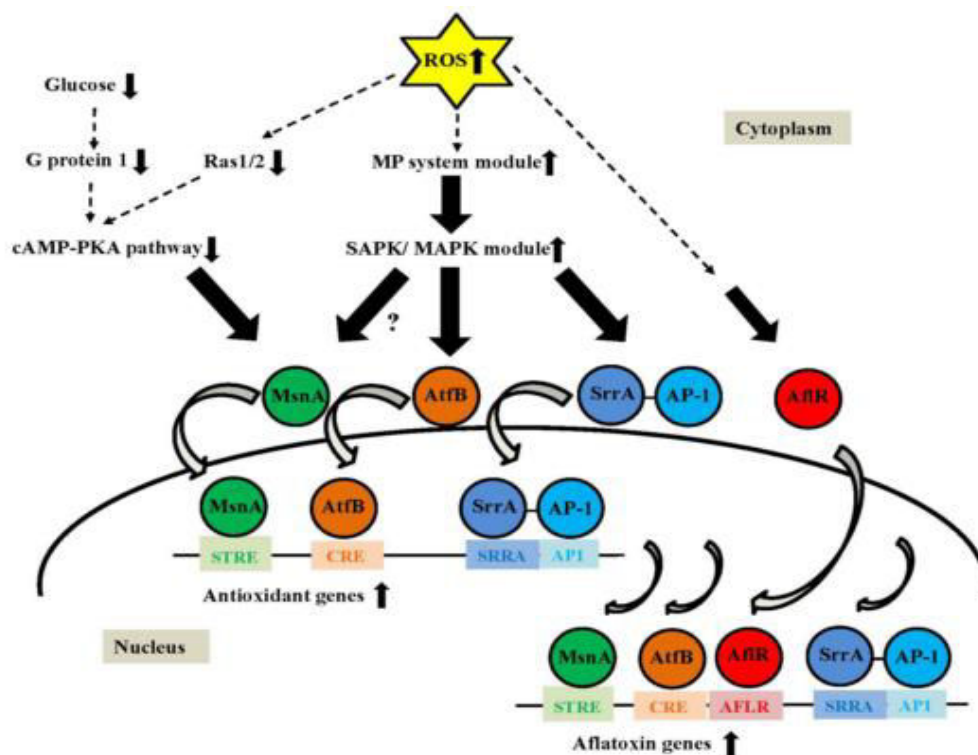


Figure 12. Modèle de l'activation transcriptionnelle des gènes dits « antioxydants » et des gènes de la voie de biosynthèse par différents facteurs de transcription en réponse au stress oxydatif (Roze et al., 2013).

D.4.4. Le rôle de VeA

Le gène *veA* a été initialement caractérisé chez *A. nidulans* comme étant un activateur de la reproduction sexuée (Kim et al., 2002). Un rôle identique lui a été attribué chez *A. flavus* dans l'étude de Duran et al. (2007). Le FT codé par ce gène a été ultérieurement caractérisé chez d'autres espèces fongiques et régule, de façon large, le métabolisme primaire et secondaire (Calvo and Bok, 2004). VeA recrute aussi d'autres facteurs, LaeA, VelB (qui recrute à son tour VosA) pour la formation du complexe Velvet, dont l'activité est modulée par la lumière. Ce complexe intervient dans le développement morphologique avec un rôle avéré dans la croissance, la conidiation et la production de sclérotés. En effet, VeA est responsable de l'activation ou de la répression de plusieurs gènes intervenant dans ces mécanismes, tels *brlA*, *rosA*, les gènes codant les oxylipines, etc. (Calvo, 2008).

Toutefois, VeA, qui est hautement conservé chez plusieurs espèces fongiques (Ramamoorthy et al., 2013), joue aussi un rôle primordial dans la coordination du métabolisme secondaire de ces dernières agissant comme un activateur ou, au contraire, comme un répresseur (Sprote and Brakhage, 2007). Chez *A. flavus*, la présence Sde VeA est essentielle pour l'expression des gènes régulateurs *aflR* et *aflS* et un mutant ΔveA ne produit plus d'aflatoxines. VeA est aussi impliqué dans la réponse au stress oxydatif chez *A. flavus*. Ainsi, une souche *A. flavus* ΔveA est plus sensible aux dommages induits par les ROS. De plus, il a été démontré que VeA pourrait moduler positivement l'expression de gènes intervenant dans la réponse au stress oxydatif tels *msnA*, *atfB* et *cat1* (Baidya et al., 2014).

E. Moyens de lutte contre les aflatoxines

Afin de réduire le risque de contamination par les aflatoxines et pallier aux problèmes sanitaires et socio-économiques qu'elles entraînent, plusieurs stratégies peuvent être mises en œuvre. Ces dernières peuvent viser soit à prévenir la contamination en limitant le développement fongique, soit agir en aval du développement fongique afin d'éliminer la toxine ou réduire sa disponibilité. Dans le premier cas, les interventions se font surtout aux champs, avant la récolte, afin de prévenir l'expansion de l'infection fongique. Tandis que dans les interventions ayant lieu après la récolte, les stratégies visent surtout à décontaminer les substrats après la synthèse de la toxine ou bien à réduire sa disponibilité en limitant son absorption par les organismes exposés.

E.1. Les bonnes pratiques agricoles

E.1.1. Au champ et durant la récolte

Le premier point critique pour limiter l'incidence d'*A. flavus* et la contamination par l'AFB1 est d'adopter des pratiques agricoles qui peuvent créer un environnement défavorable pour la prolifération des spores de champignons pouvant être présentes dans le sol. Ces pratiques incluent le labour du sol avant la semence, un désherbage, le respect de la période de semis spécifique à chaque type de culture et du moment optimal de récolte, le fumage, l'amendement et la fertilisation du sol, la gestion de l'irrigation ainsi qu'une rotation des cultures avec des cultures qui sont moins sensibles au développement d'*A.*

flavus (Torres et al., 2014; Waliyar et al., 2013). L'utilisation de la chaux (CaO) pourrait, à elle seule, réduire les taux d'aflatoxines de 72%, et, combinée avec du fumier, ce taux pourrait atteindre 84% (Waliyar et al., 2013). D'autres sources de calcium comme le gypse (sulfate minéral) pourraient également réduire l'incidence de l'aflatoxine B1.

De même il faut éviter au maximum les dommages mécaniques qui rendent les grains plus vulnérables à l'infection fongique tout comme l'infestation par des insectes (Diao et al., 2015). Il est préférable de récolter les épis de maïs dans leurs feuilles et s'assurer que ces dernières ne sont pas endommagées puisqu'elles jouent un rôle essentiel dans la protection des épis contre les insectes et surtout les charançons (*Sitophilus zeamais*), ravageurs les plus fréquents des cultures de maïs. Non seulement ces insectes augmentent la surface de l'épi susceptible à l'infection fongique mais ils peuvent aussi humidifier les grains par leur activité métabolique propre et favoriser ainsi le développement fongique (Udoh et al., 2000). Il convient aussi d'éviter les dommages mécaniques durant le battage des plantations car cela favorise l'entrée des insectes. Les lésions des cosses d'arachides produites suite aux attaques d'insectes peuvent engendrer une contamination par les aflatoxines des grains y compris si les conditions environnementales ne sont à priori pas très favorables (Torres et al., 2014). Le champignon peut alors se développer à l'intérieur et se trouve ainsi à l'abri et au contact direct des nutriments.

La période de récolte joue également un rôle essentiel dans la prévention du développement fongique. Il est recommandé de récolter juste après que la maturité physiologique soit atteinte afin de limiter la contamination par les aflatoxines (CAC, 2004). Cependant les denrées récoltées juste à maturité doivent être rapidement et efficacement séchées afin d'atteindre des niveaux d'humidité ne permettant plus la croissance fongique (10-13% pour les céréales, 8% pour les arachides) et éviter ainsi tout développement fongique éventuel au cours du stockage qui suit (Diao et al., 2015; Torres et al., 2014; Waliyar et al., 2013). Les conditions climatiques observées dans de nombreux pays en développement et qui combinent souvent un séchage initial insuffisant et un niveau d'humidité atmosphérique élevé contribuent pour beaucoup à la contamination des récoltes et aux niveaux souvent élevés d'aflatoxines observées dans les matières

premières agricoles (Torres et al., 2014). De plus, une période de séchage prolongée au champ expose les grains aux attaques de différents nuisibles et pourrait ainsi entraîner des pertes plus grandes durant le stockage (Borgemeister et al., 1998; Hell and Mutegi, 2011).

Malheureusement, la mise en œuvre de ces bonnes pratiques de stockage et un bon séchage sont souvent difficiles à mettre en œuvre par les agriculteurs ayant des petites parcelles et notamment lorsque les conditions climatiques générales sont défavorables (régions tropicales et subtropicales). De plus, l'effet de la rotation des cultures et de la plupart des bonnes pratiques agricoles reste plus limité sur la toxino-génèse que l'impact des facteurs environnementaux (température et humidité). Les populations aflatoxinogènes peuvent être très nombreuses dans les sols des régions semi-arides et dans ce cas la rotation des cultures reste, à elle seule, incapable de les limiter (CAC, 2004).

E.1.2. Les conditions de stockage

Bien que les pratiques agricoles mises en place aux champs et au moment de la récolte soient essentielles pour limiter la contamination par les champignons aflatoxinogènes et la production d'aflatoxines, les conditions de stockage constituent des facteurs primordiaux pour limiter l'expansion du développement fongique et éviter la production de toxines pendant cette période, qui peut être prolongée. Il a même été suggéré que les épidémies d'aflatoxicoses en Kenya en 2004 et 2005 ont eu lieu suite à une contamination après la récolte (Amaike and Keller, 2011). En effet, si *A. flavus* contamine les cultures aux champs, il peut ensuite se développer rapidement durant le stockage, si les conditions lui sont favorables, et produire alors des quantités importantes d'aflatoxines (Sétamou et al., 1997; Torres et al., 2014). Pour limiter le risque, le stockage des grains séchés devrait avoir lieu dans un endroit propre, sec, à des températures tempérées et à l'abri des infestations d'insectes. Il convient aussi d'éviter toute réhumidification pendant le stockage. Une telle réhumidification peut résulter de fuites dans les toits des locaux de stockage, d'une mauvaise ventilation des silos générant une condensation d'eau, ou bien d'une humidité initiale trop élevée des grains avant le stockage (Torres et al., 2014). De même, la durée de stockage dans les silos devrait être la plus courte possible. Les taux d'aflatoxines peuvent être multipliés par 10 sur une période de 3 jours dans des conditions d'humidité favorables

pendant le stockage (Hell et al., 2008). Dans l'étude de Kaaya et Kyamuhangire (2006), les taux d'AFB1 détectés dans les échantillons de maïs étaient plus élevés dans les grains stockés plus de 6 mois que dans ceux stockés pendant 2 à 6 mois. Des inspections régulières devraient aussi être effectuées sur les grains en stockage afin de détecter un début de développement fongique le plus tôt possible et de limiter son extension et les pertes associées. L'examen mycologique pourrait être utilisé comme un outil de surveillance.

Une étape importante pour limiter la contamination mycotoxique pendant le stockage des arachides est un tri des grains avant le stockage (Torres et al., 2014). Plusieurs méthodes peuvent être utilisées : tri manuel, séparation selon la taille ou la densité des grains, tri photo-électrique selon la couleur. Ce dernier semble être plus efficace quand il est précédé d'un procédé dit de « blanchiment » des grains. Le blanchiment consiste à enlever le péricarpe des arachides ainsi que la poussière, les moisissures, et autres matières étrangères et permet une meilleure détection de la couleur. Cette dernière technique pourrait réduire le taux d'aflatoxines jusqu'à 91% (Dorner, 2008). Cependant une décoloration des grains n'implique pas systématiquement la présence d'une contamination (Torres et al., 2014). La plus grande limite à cette technique reste son coût élevé (Dorner, 2008).

Depuis quelques années, l'introduction de la démarche HACCP (« **H**azard **A**nalysis of **C**ritical **C**ontrol **P**oints ») se généralise afin de prévenir et limiter les risques associés à ces toxines. Les facteurs influençant la contamination par les aflatoxines aux champs étant difficilement prédictibles et contrôlables, les points critiques de contrôle sont plutôt situés durant la récolte, le séchage et le stockage des produits agricoles (CAC, 2004).

E.2. Les pesticides

L'efficacité évidente de certains pesticides pour contrôler le développement de différents pathogènes agricoles et augmenter ainsi la productivité a entraîné un usage massif de ces composés depuis les années 1950. Il apparaît désormais que cette stratégie atteint ses limites pour plusieurs raisons : contamination de l'environnement et effets néfastes sur la biodiversité animale et végétale ; perte d'efficacité par apparition de

résistances chez les organismes cibles et enfin, toxicité propre de ces composés chez les mammifères lors d'exposition prolongée.

E.2.1. Les fongicides

Les fongicides ont été considérés pendant des années comme essentiels pour maintenir des cultures saines avec une bonne productivité (Brent and Hollomon, 2007).

Il existe 6 catégories majeures de fongicides : (i) les dithiocarbamates, (ii) les organochlorés, (iii) les dicarboximides, (iv) les benzonitriles, (v) les carbamates et (vi) les inhibiteurs de la synthèse de l'ergostérol. Ces composés diffèrent par leurs structures chimiques et donc par leurs modes, sites et spectres d'action sur le pathogène, définissant ainsi les modalités de leurs usages.

Il a été également démontré que certains produits peuvent agir directement sur la voie de biosynthèse des aflatoxines et bloquer l'activité des enzymes intervenant dans la cascade enzymatique de cette voie. Néanmoins, ces effets restent peu documentés et souvent contradictoires. Ainsi, si certains pesticides sont capables de bloquer la production d'AFB2 et d'AFG2 chez *A. parasiticus*, ils pourraient inversement entraîner l'accumulation d'AFB1 et d'AFG1. Un dicarboximide, l'iprodione, agissant sur les oxydases et bloquant ainsi la transformation de la versicolorine, un intermédiaire dans la voie de biosynthèse d'AF, a pu bloquer la totalité de la voie de biosynthèse dans deux souches mutantes d'*A. parasiticus* (Hasan, 1999). Toutefois, des études ont montré que l'efficacité des fongicides est contradictoire et, dans plusieurs cas, les effets sont inattendus. Le Chlobenthiazole, un benzonitrile, se montre efficace pour bloquer leur production *in vitro* chez *A. flavus*. Cependant, l'effet opposé a été observé chez *A. parasiticus* où la synthèse d'aflatoxines a été stimulée (Wheeler et al., 1991). Des essais en laboratoire ont également montré qu'*A. parasiticus* produisait plus d'aflatoxines suite à des traitements par les fongicides miconazole et fenpropimorphe (D'Mello et al., 1998).

Cependant, une limite croissante à l'usage des fongicides est leur toxicité propre, surtout quand leur usage est inapproprié ou dépasse les normes recommandées. Ainsi une substance chimique modérément inoffensive à de faibles doses pourrait facilement devenir

toxique et oncogène à de plus fortes doses (Blair, 1989). La toxicité aiguë des fongicides vis-à-vis des êtres humains est faible. Les effets les plus communs aux fongicides utilisés dans les procédés agricoles sont des dermatites allergiques et des irritations de la peau et des muqueuses (Schneider and Dickert, 1994). Cependant, une exposition prolongée pourrait avoir des conséquences néfastes plus graves et notamment des effets carcinogènes et/ou mutagènes. De plus, de nombreux résidus de fongicides différents peuvent être détectés dans le sérum, l'urine et le tissu adipeux des humains (Blair, 1989). Puisqu'il n'est pas possible de conduire des recherches de toxicité sur les humains, le potentiel toxique des fongicides a été extrapolé de tests effectués sur des modèles animaux (Schneider and Dickert, 1994).

Ainsi, il a été montré que toutes les classes chimiques utilisées en agriculture peuvent avoir une toxicité cutanée et entraîner, à forte dose, des dermatites, démangeaisons, allergies, brûlures, etc. (Bruynzeel and Van Ketel, 1986; Gocmen et al., 1989; Larsen, Anders et al., 1990; Saunders and Watkins, 2001; Schneider and Dickert, 1994). Toutefois, les dithiocarbamates et les dicarboximides peuvent aussi, suite à leur métabolisation par les mammifères, être cancérigènes et tératogènes (Schneider and Dickert, 1994). Les organochlorés peuvent causer une porphyrie ainsi que des symptômes neurologiques et orthopédiques (Gocmen et al., 1986). Quant aux inhibiteurs de l'ergostérol, ils peuvent induire des irritations des yeux et agir sur la synthèse de stéroïdes par les gonades et interférer avec le développement sexuel mâle (Chin et al., 1981).

Une autre limite croissante à l'usage des pesticides est liée à l'apparition progressive de mécanismes de résistance chez les organismes cibles. Ainsi, une étude menée sur 3 ans au Mississippi (États Unis) a montré qu'aucun des 5 types de fongicides appliqués (azoxystrobin, pyraclostrobin, propiconazole, tetraconazole et dithiocarbamate) ni des mélanges de trifloxystrobin et de propiconazole ou d'azoxystrobin et propiconazole, n'était capable de réduire d'une façon significative la contamination par les aflatoxines observée dans les champs de maïs (Abbas et al., 2009). La résistance aux fongicides provient essentiellement de modifications au niveau des sites d'action chez le pathogène cible. Certains fongicides, surtout ceux possédant un site unique d'action au niveau du

champignon, sont plus sensibles au risque de développement d'une résistance. Les mécanismes de résistance sont souvent liés à l'apparition de mutations dans le génome du pathogène en question. Une sporulation abondante ainsi qu'une dispersion étendue des spores sont des facteurs pouvant augmenter davantage le risque de développement de résistance (Brent and Hollomon, 2007).

E.2.2. Les insecticides

L'infestation des grains par les insectes propageant les spores de champignons toxigènes appartenant aux espèces *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* et *Aspergillus*, est fréquente (Khan et al., 2016; Lamboni and Hell, 2009). En empêchant les attaques d'insectes sur les cultures et ensuite au stockage, les insecticides peuvent réduire l'occurrence des spores des espèces aflatoxinogènes et par la suite la production des aflatoxines.

Plusieurs insecticides (Spinosad, Thiamethoxam, Imidacloprid, Indoxacarb) ont été utilisés pour protéger les cultures des insectes et la corrélation avec les taux d'aflatoxines produits a été évaluée. Dans les différentes combinaisons de traitements testées, la production d'aflatoxines a été directement corrélée aux taux de survie des insectes. Les insecticides Spinosad et Indoxacarb ont un effet indirect sur la contamination par l'aflatoxine B1 en induisant la mortalité des insectes *Rhyzopertha dominica* (Khan et al., 2016; Vayias et al., 2010). À l'exception de Thiamethoxam, ces insecticides sont inefficaces pour contrôler *Sitophilus oryzae*, un vecteur fréquent des spores d'*A. flavus* (Sinha and Sinha, 1991). De plus, l'étude de Vayias et al. (2010), a montré que l'efficacité de Spinosad est moins importante sur le maïs que sur les autres productions testées (blé et orge). Ces études montrent les limites du spectre d'action de Spinosad. Son efficacité à long terme, est mise en question puisque ses effets diminuent avec la durée de stockage. Il semble donc nécessaire de considérer des combinaisons d'insecticides, surtout si plusieurs espèces d'insectes peuvent coexister dans une région, afin de pouvoir améliorer la protection des cultures. Cependant il se pose alors la question de la toxicité combinée des différents composés utilisés. Il est, de même, essentiel de noter que la persistance de l'effet insecticide

et l'efficacité à long terme de ces composés méritent également des études plus approfondies.

La toxicité des insecticides, comme celle des pesticides en général, est une problématique majeure à l'heure actuelle. Ces composés peuvent induire un stress oxydatif au niveau cellulaire. Ce dernier se définit par un déséquilibre entre les radicaux libres et les défenses anti-oxydantes de l'organisme, ce qui entraîne la peroxydation des lipides membranaires. Ceci peut entraîner, chez l'homme ou les mammifères, des lésions dans de nombreux tissus (nerveux, hépatique et rénal) (Abdollahi et al., 2004; Hasan, 1999).

La prise de conscience des possibles effets toxiques, du coût, et du risque environnemental représenté par l'usage intensif des pesticides, a justifié certaines mesures et limitations à l'usage de ces composés en Europe au profit des cultures plus biologiques et durables (The Council of the European Communities, 1991). En France, cette prise de conscience s'est aussi traduite par l'adoption du plan Ecophyto 2018 qui avait pour objectif de réduire de 50% l'usage des pesticides en agriculture à l'horizon 2018. Cependant, les résultats obtenus jusqu'à présent ont montré que cet objectif était loin d'être atteint et un nouveau plan a été mis en route pour atteindre cet objectif mais cette fois d'ici 2025.

Il semble donc important de trouver des alternatives à l'usage exclusif des pesticides pour contrôler la croissance fongique et la contamination mycotoxique et ainsi garantir la sécurité des aliments tout en développant des pratiques agricoles durables et plus respectueuses de l'environnement.

E.3. Utilisation du génie génétique pour créer des cultures résistantes

E.3.1. Cultures résistantes aux insectes

Des gènes de résistance d'origine bactérienne ont aussi été identifiés et utilisés pour l'élaboration de lignées résistantes de maïs et d'arachides. Ainsi, des cultures de maïs ayant des gènes de l'espèce bactérienne *Bacillus thuringiensis* (Bt) afin de lutter contre les attaques d'insectes ont montré une résistance à la contamination par les aflatoxines. Les gènes des souches Bt codent des protéines cristallines présentant une toxicité pour la plupart des insectes de l'ordre des Lépidoptères (Wu, 2013). Cependant il est difficile de

sélectionner une lignée élite pouvant résister aux changements environnementaux tout en maintenant des rendements élevés aux champs (Hell and Mutegi, 2011; Torres et al., 2014).

E.3.2. Cultures résistantes au développement d'*A. flavus* et/ou à la production de l'aflatoxine

Les screenings protéomiques effectués sur des lignées hybrides de maïs résistantes à *A. flavus* (ex. AO901-25, GT-MAS:gk, Tex6, Mp420 et Mp313E) ont permis l'identification de protéines de défense produites par ces lignées, responsables de cette résistance (Alakonya and Monda, 2013; Brown et al., 2013; Huang et al., 1997). Ces protéines incluent des composés phénoliques tels l'alkylresorcinol (Brown et al., 2010), la zéamantine, des protéines inactivant les ribosomes (RIP) (Guo et al., 1997) et une protéine inhibitrice de l'amylase fongique qui limite l'utilisation par *A. flavus* des glucides présents (Chen et al., 1999). Ces protéines pourraient représenter de nouveaux marqueurs de résistance pour la sélection variétale et être des cibles pour le clonage et l'introduction de nouveaux gènes dans des cultures sensibles aux aflatoxines (Brown et al., 2013).

D'autre part, une biotechnologie récente d'interférence d'ARN (ARNi) utilise des courtes séquences génomiques fongiques (siARN) de 21-24 nucléotides, complémentaires aux ARNm des gènes cibles (Alakonya and Monda, 2013). Ces séquences qui seraient donc induites chez les plantes, ont la capacité de se lier à des endonucléases et d'induire la dénaturation des séquences des ARNm des gènes cibles chez le champignon. La technique est connue sous le nom de « gene silencing ». Les pistes d'utilisation dans le contrôle de la contamination fongique peuvent viser le blocage de gènes de développement tel la β -tubuline (Brown et al., 2010) ou bien, plus directement, des gènes de la voie de biosynthèse des aflatoxines tel *aflD* (*nor-1*), codant pour une enzyme responsable de la transformation de l'acide norsolorinique (NOR), le premier intermédiaire stable de la voie de biosynthèse des aflatoxines, en averantine (Abdel-Hadi et al., 2011). Dans cette dernière étude, le choix d'*aflD* a été basé sur le fait que ce gène permet de discriminer les souches aflatoxinogènes des non-aflatoxinogènes. Après traitement par les siARN, les cultures d'*A. flavus* et d'*A. parasiticus* ont présenté une chute des niveaux d'expression d'*aflD* et *aflR*, ce dernier étant le principal facteur régulant l'expression du cluster de gènes impliqué dans la synthèse des

aflatoxines. Cet effet a été accompagné par une inhibition de 97% de la production d'aflatoxines. Les techniques de « gene silencing » ou ARNi pourraient donc permettre à l'avenir de créer des lignées de maïs transgéniques résistantes à l'infection par *A. flavus* ou capables d'empêcher la moisissure de produire sa toxine au cours de son développement (Alakonya and Monda, 2013; Brown et al., 2013).

Toutefois, ces options se heurtent à plusieurs limites : coût du développement et de l'usage de ces méthodes, questions éthiques posées, au moins en Europe, quant à l'usage des cultures génétiquement modifiées (Wu, 2013).

E.4. Les stratégies de bio-contrôle

Un agent de bio-contrôle est un antagoniste microbien qui permet la maîtrise de l'agent pathogène en : i) réduisant sa population et par conséquent son impact économique, ii) réduisant sa disponibilité vis à vis des organes/tissus cibles et iii) limitant l'incidence de la pathologie (Waliyar et al., 2013). Plusieurs agents antagonistes microbiens et fongiques ont été évalués pour leur effet antagoniste vis-à-vis d'*A. flavus*.

E.4.1. Bio-contrôle par des souches fongiques non toxiques

Des stratégies de bio-contrôle basées sur l'inoculation du sol par des souches non-toxinogènes d'*A. flavus* ou d'*A. parasiticus* ont été développées. Ces souches entrent en compétition avec les souches toxinogènes. Ainsi, en se développant, elles limitent l'infection et le développement des souches toxinogènes (Torres et al., 2014). De plus, leur effet pourrait être maintenu durant le stockage (Dorner and Cole, 2002). Plusieurs souches atoxinogènes ont été approuvées aux Etats Unis par l'Agence de Protection Environnementale (EPA) et sont désormais commercialisées comme biopesticides appliqués aux cultures d'arachides, de maïs et de graines de coton (Dorner, 2009).

Ces souches atoxinogènes ont été isolées de sols aux Etats Unis et possèdent des mutations qui les empêchent de produire l'aflatoxine et parfois d'autres métabolites tel l'ACP (également toxique) (Chang et al., 2012a; Ehrlich, 2014). Leur capacité à synthétiser de l'ACP et à produire des sclérotés permet de les classer dans des groupes de compatibilité végétative (VCG) selon le type de mutation qu'elles présentent (Chang et al., 2005). Ainsi, la

souche ATCC 96045 ou AF36®, la première à avoir été approuvée par l'EPA, a été isolée à partir de cultures de graines de coton en Arizona (Cotty, 1990). Il a ainsi été démontré qu'AF36 présente un polymorphisme au début de la séquence codante du gène *aflC* (*pksA*). Le changement du nucléotide G en A à la position 591 induit la formation d'un codon stop (TGA) et résulte en une protéine tronquée non fonctionnelle (Ehrlich and Cotty, 2004). Cependant AF36 produit toujours de l'ACP, composé produit dans les mêmes conditions environnementales que l'AFB1. Ainsi il en résulte une accumulation de cette molécule lorsque des cultures de maïs sont inoculées avec cette souche (Abbas et al., 2011; Ehrlich, 2014). La souche NRRL21882, composant actif du biopesticide Afla-Guard®, a, elle, été isolée d'arachides dans l'état de Georgie aux Etats Unis. Cette souche est dépourvue de la totalité des clusters des aflatoxines et de l'ACP. Elle est utilisée comme agent de bio-contrôle surtout dans les cultures d'arachides (Chang et al, 2005). Son utilisation a pu réduire les populations aflatoxinogènes de 71% dans le sol de ces cultures avant traitement à 4% après application. Cela s'est accompagné d'une réduction du taux d'aflatoxines dans les arachides de 85 à 98% dans les produits égrenés destinés à la consommation (Dorner and Lamb, 2006; Dorner, 2009). La dernière souche utilisée, appelée souche K49, a été isolée de cultures de maïs du Mississippi (Chang et al., 2012a) et elle appartient au même VCG (B) que la souche AF36 (Abbas et al., 2011). Cependant, elle possède un polymorphisme supplémentaire au niveau d'un nucléotide du gène *dmaT*, ce qui l'empêche de produire de l'ACP, contrairement à AF36 (Chang et al., 2012a). K49 est surtout utilisée dans les cultures de maïs où elle a prouvé son efficacité à réduire les taux d'aflatoxines sur plusieurs années d'essai aux champs (Abbas et al., 2006). L'inoculation de cette souche par vaporisation des épis s'est révélée plus efficace pour réduire les niveaux d'aflatoxines (97%) que son application sur le sol des cultures (65%) (Lyn et al., 2009). Selon Abbas et al., 2011, les souches atoxinogènes d'*A. flavus* K49 et NRRL21882 sont plus efficaces qu'AF36 avec des pourcentages de réduction de la contamination en aflatoxines en ACP plus élevés que dans les cultures de maïs. D'autres souches atoxinogènes pourraient aussi être des agents de bio-contrôle potentiels tels TX9-8, AF051, T0φ, La3279, F3W4 et K54 (Chang et al., 2012a; Jane et al., 2014).

Cette approche d'exclusion par compétition a également démontré son efficacité pour réduire la contamination par les aflatoxines au champ en Afrique (Atehnkeng et al., 2008). Une formule regroupant 4 souches atoxinogènes originaires du Nigeria est commercialisée sous le nom d'Aflasafe™. Des souches candidates ont été également sélectionnées au Kenya, Sénégal, Zambie et Burkina Faso pour adapter Aflasafe à la microflore de ces pays (Hell and Mutegi, 2011; Marechera, 2015; Odhiambo et al., 2014). Dans ces pays, les essais aux champs ont démontré une grande efficacité de ces produits à réduire la contamination par les aflatoxines dans les cultures de maïs et d'arachides par 80-90% et même jusqu'à 99% (Bandyopadhyay et al., 2015). Cette stratégie est aussi appliquée en Australie et en Argentine et des études sont en cours en Thaïlande (Pitt et al., 2015), en Italie (Mauro et al., 2015) et en Chine (Zhou et al., 2015).

La méthode et le taux d'inoculation ainsi que la période d'application des souches atoxinogènes d'*A. flavus* sont des facteurs influençant directement leur efficacité (Jane et al., 2014). La capacité d'une souche fongique à concurrencer une autre dépend aussi de plusieurs facteurs tels le pH, le type de sol et l'apport en azote, carbone, eau et minéraux. Les changements climatiques globaux observés depuis plusieurs années constituent également un vrai défi à l'utilisation de ces souches puisqu'ils peuvent altérer l'environnement du sol ainsi que son microbiome (Hell and Mutegi, 2011; Jane et al., 2014).

Cependant cette stratégie de lutte présente une limite majeure. Elle est liée au fait qu'*A. flavus* est capable de se reproduire de façon sexuée dans certaines conditions et donc d'échanger son matériel génétique par recombinaison. Cela pourrait ainsi changer le matériel génétique des souches d'intérêt par recombinaisons et entraîner, à terme, une récupération du pouvoir toxigène des souches atoxinogènes (Olarte et al., 2012). Par conséquent, l'utilisation de ces souches et leur efficacité à long terme méritent une évaluation plus approfondie.

E.4.2. Bio-contrôle par des souches bactériennes

E.4.2.1. Les bactéries ubiquitaires du sol

Des souches bactériennes bio-compétitives ubiquitaires du sol peuvent aussi être utilisées pour leurs effets antagonistes sur différentes espèces d'*Aspergillus* ainsi que d'autres champignons toxigènes (Shams-Ghahfarokhi et al., 2013 ; Tsitsigiannis et al., 2012). Ces bactéries, de distribution mondiale, appartiennent surtout aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas*, ainsi que *Agrobacterium* et *Streptomyces*. Ces espèces sont capables de produire des endospores et des composés bioactifs à large spectre d'activité rendant possible leur utilisation en tant qu'agents potentiels de biocontrôle (Shams-ghahfarokhi et al., 2013). C'est en 1988 qu'une souche de *Bacillus subtilis* a été identifiée comme ayant un effet inhibiteur sur le développement des souches d'*A. flavus* NRRL 3357 et d'*A. parasiticus* NRRL2999 (Kimura and Hirano, 1988). Le métabolite actif, l'iturine A, a été breveté pour le contrôle des aflatoxines dans les céréales et graines oléagineuses (Mehdi Razzaghi-Abyaneh, 2013). Il existe d'autres exemples de molécules actives d'origine bactérienne. Ainsi, les blasticidines A et S, l'aflastatine A et la dioctatine A sont des métabolites produits respectivement par des souches de *S. griseochromogenes*, *Streptomyces* sp. MRI142 et *Streptomyces* sp. SA-2581 et qui présentent toutes un effet anti-aflatoxinogène lié à une inhibition au niveau transcriptomique de la voie de biosynthèse de l'AF (Razzaghi-Abyaneh et al., 2010). Enfin, une souche de *Bacillus megaterium*, isolée de la mer jaune en Chine de l'Est, a été évaluée pour son potentiel à réduire l'altération liée à *A. flavus* sur des grains d'arachides après la récolte. Les résultats *in vivo* (sur grains) confirment la capacité de cet antagoniste à réduire la biosynthèse de l'aflatoxine grâce à une modulation négative de l'expression des deux gènes codant les co-activateurs du cluster que sont *aflR* et *aflS* (Kong et al., 2010).

E.4.2.2. Les bactéries lactiques

Parmi les souches bactériennes exerçant une inhibition sur la synthèse de mycotoxines, les bactéries lactiques (LAB) ont également démontré une efficacité à inhiber la production d'aflatoxines par *A. flavus* et *A. parasiticus*, *in vitro*. Les LAB sont des microorganismes

largement utilisées dans les procédés fermentaires alimentaires et font également partie de la flore intestinale humaine normale (Dalié et al., 2010). Elles peuvent aussi se trouver dans le sol (Chen et al., 2005) et représenter des agents de bio-contrôle pour les cultures. Les espèces de LAB anti-mycotoxinogènes connues appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* (Ahlberg et al., 2015). En acidifiant le milieu, ces bactéries acquièrent une prédominance compétitive et épuisent les nutriments du milieu, bloquant ainsi la croissance d'autres espèces (De Muynck et al., 2004). De plus, des études ont démontré une diminution de la contamination par des mycotoxines, pouvant aller jusqu'à 50% pour les aflatoxines (AFB1 et AFG1), dans les aliments fermentés par les LAB. Ce phénomène pourrait être lié à une dégradation de la toxine présente dans le milieu. Ainsi, les niveaux d'AFM1 dans le lait peuvent être réduits de 34% par fermentation et stockage de yaourts ayant un pH de 4 (Juodeikiene et al., 2012). Un traitement par une souche ou bien un mélange de plusieurs LAB (*Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*) ainsi que d'autres bactéries produisant de l'acide acétique pourrait permettre une inhibition totale du développement d'*A. flavus* et donc éviter la production d'aflatoxines dans les aliments fermentés (Ahlberg et al., 2015; Silva et al., 2015).

En pratique, plusieurs produits commerciaux à base de bactéries ou même de levure sont ainsi commercialisés dans le monde comme moyen de lutte contre les champignons mycotoxinogènes. On trouve par exemple Aspire (*Candida oleophila* souche 182; Ecogen Inc., Langhorne, PA) et Bio-Save 10 et 11 (*Pseudomonas syringae* souches ESC10 and ESC 11; EcoScience Corp., Worcester, MA) (Tsitsigiannis et al., 2012). Cependant, le spectre d'activité des souches bactériennes et de leurs métabolites est généralement plus étroit que celui des souches fongiques atoxinogènes. La réponse des souches aflatoxinogènes est souvent variable (Klich et al., 1993). De plus, pour entrer en compétition avec les souches fongiques, il faut que les LAB se développent. Or leurs conditions de croissance sont plus étroites que celles permettant la croissance fongique (températures entre 28 et 45°C et des pH entre 4,5 et 7,5), notamment en ce qui concerne la présence d'oxygène car ces bactéries sont microaérophiles (Silva et al., 2015). Par conséquent, une difficulté supplémentaire à

cette stratégie est de trouver des souches suffisamment résistantes aux stress environnementaux et aux conditions extrêmes qui favorisent le développement des souches d'*A. flavus* et *A. parasiticus* et la production d'aflatoxines.

E.5. Détoxification physico-chimique

Contrairement aux moisissures, les mycotoxines sont des molécules très résistantes à différents traitements (chaleur, pression, traitements chimiques, etc.) et elles ne peuvent pas être éliminées par une simple cuisson. La dénaturation de l'AFB1, la plus résistante des aflatoxines, est atteinte à partir de 267°C et des températures supérieures à 150°C sont nécessaires pour atteindre une dénaturation partielle (Rustom, 1997). Toutefois, certains procédés physico-chimiques ont été testés pour réduire les taux de mycotoxines dans les aliments. Ces derniers incluent: le broyage, le brassage, la torrification, la nixtamalisation (procédé utilisé pour la fabrication des tortillas), l'extrusion, l'irradiation (lumière pulsée, UV, rayons γ , dégradation solaire), l'ozonation, etc. (Bullerman and Bianchini, 2007; Chen et al., 2014; Riley and Norred, 1999; Wang et al., 2016). Le **Tableau 7** présente l'efficacité de ces procédés à réduire les taux d'AFB1 dans différentes denrées alimentaires analysées.

Il a également été montré que l'humidité de l'aliment contribue positivement à la destruction de l'AFB1 par irradiation et ozonation. Les molécules d'eau présentes dans le milieu peuvent s'intégrer au cycle lactone, provoquant son ouverture et augmentant sa sensibilité à la décarboxylation et la photo-destruction (Rustom, 1997).

Récemment, Bethke et al. (2015), ont breveté un procédé permettant la réduction des taux d'aflatoxines dans les grains de maïs. Le principe repose sur la séparation des grains contaminés de ceux non contaminés dans un liquide aqueux de qualité alimentaire, où les grains contaminés flottent à la surface. Suite à la contamination, une altération des propriétés physiologiques des grains a lieu, entraînant une altération de leur densité. L'élimination de ces dernières se fait par la suite par aspiration sous vide. La réduction des taux d'aflatoxines peut atteindre 80-90% avec des concentrations résiduelles inférieures 10 ppb et les pertes de grains sont entre 1-3 et 15%, selon le niveau initial de contamination. Ce procédé semble intéressant cependant son usage à grande échelle nécessite une optimisation et des études plus approfondies. De plus, cette technique ne

peut être appliquée que sur les matières premières destinées à la transformation avant consommation sinon le coût du séchage des grains après traitement sera probablement trop élevé.

Tableau 7. Méthodes de détoxification physico-chimiques des aflatoxines : conditions adoptées, denrées utilisées et efficacité du traitement

Type	Procédé	Conditions de traitement	Denrées traitées	Réduction d'AFB1	Références	
Physique	Exposition solaire	30 heures		60%	(Herzallah et al., 2008)	
	Irradiation aux microondes	10 min	Aliment volailles	32,3%		
	Irradiation aux rayons γ	25 kGy			42,7%	(Prado et al., 2003)
		15-30 kGy	Arachides		55-74%	
	Extrusion brute	>160°C	Maïs		50-80%	(Hameed, 1993)
	Extusion+ ajout d'ammonium	hydroxide (0.7-1.0%) ou bicarbonate (0.4%)	Maïs		95%	
Torréfaction	150°C, 30 min	Arachides		70%	(Ogunsanwo and Faboya, 2005)	
Chimique	Nixtamalisation traditionnelle (TNP)	2 L eau/kg grain de maïs, 2% CaOH ₂ , 85°C, 70 min	Grain de maïs	90-92%	(Mendez-Albores et al., 2004)	
	Nixtamalisation écologique (ENP)	0.8 L eau/kg de maïs broyé, 0.3% CaOH ₂ , 92°C, 10 min	Maïs broyé	68-71%		
	Ozonation	6 mg/L ozone, 30 min, T° ambiante	Maïs et poudre de riz		100%	(Prudente and King, 2002)
		75°C, 10 min	Arachides		77%	(Proctor et al., 2004)
	Ammoniation à P atm	2% ammonium	Maïs		88%	(Nyandieka et al., 2009)
	Ammoniation à haute pression	2% ammonium	Maïs		98%	

Les traitements chimiques visant la détoxification de l'AFB1 présente dans les denrées alimentaires sont surtout appliqués pour les produits à destination de l'alimentation animale. Ces traitements consistent, par exemple, en l'ajout d'ammonium, de bisulfite de sodium, hydroxyde de calcium, de formaldéhyde ou d'hypochlorite de sodium, de

permanganate de potassium, de peroxyde d'hydrogène ou de borate de sodium. Ils peuvent agir en se liant à l'AFB1 et en altérant ainsi sa métabolisation et en limitant secondairement l'apparition d'adduits à l'ADN ou bien, au contraire, en favorisant la métabolisation de l'AFB1 en des produits supposés moins toxiques. Pourtant la stabilité des métabolites formés n'est pas garantie, surtout aux pH acides rencontrés dans l'estomac des animaux monogastriques (Piva et al., 1995). Cependant ces méthodes sont en général corrosives et nécessitent des installations particulières et coûteuses (Piva et al., 1995; Rustom, 1997).

L'ammoniation était la méthode la plus utilisée pour réduire les taux d'aflatoxines en alimentation animale. L'ajout d'ammonium entraîne l'hydrolyse du cycle de lactone de l'AFB1 suivie par une décarboxylation, aboutissant à l'AFD1, moins toxique que l'AFB1 (**Figure 14**). L'efficacité de ce processus est positivement corrélée à la quantité d'ammonium, au temps de la réaction, à la température et au niveau de pression appliqué (Grenier et al., 2009). La réaction est réversible sur une durée de traitement insuffisante. L'ajout de formaldéhyde permet de diminuer les concentrations d'ammonium et facilite la dénaturation irréversible du cyclopeptone. Toutefois, ce procédé présente également des limites. Ainsi, il augmente le taux total en azote avec une augmentation des produits azotés non protéiques et diminue significativement le taux des acides aminés (Cystéine, Méthionine et Lysine) (Piva et al., 1995).

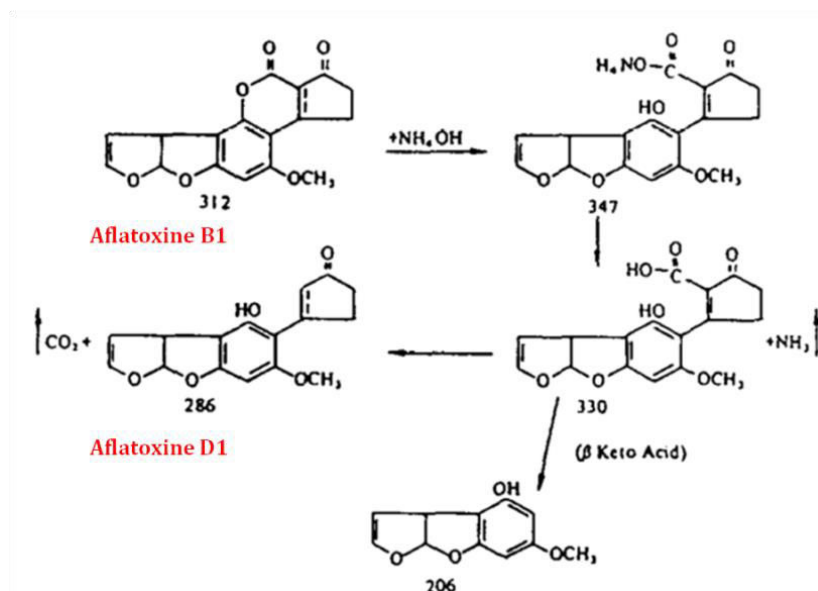


Figure 13. Réaction d'ammoniation de l'aflatoxine B1 (adapté de Piva et al, 1995).

Bien que ces procédés de transformation soient capables, dans certaines conditions, de réduire les taux d'aflatoxines contaminant les aliments (A. Mendez-Albores et al., 2004; Salazar et al., 2014), leur efficacité reste insuffisante pour garantir une protection efficace des consommateurs et ne peuvent être utilisés comme moyen unique de protection. On peut donc conclure que l'élimination (dénaturation) des aflatoxines dans la matrice alimentaire est très difficile à concilier avec la conservation de la qualité structurale et/ou organoleptique des aliments. Cette stratégie se heurte aussi au problème du coût lié à l'industrialisation de tels procédés, ce qui en limite l'utilisation.

E.6. Adsorption

S'il est difficile de dénaturer l'AFB1 sans altérer l'aliment, une autre stratégie peut viser à limiter la disponibilité de la toxine après ingestion par l'animal. En effet, en réduisant la biodisponibilité de la toxine dans le tube digestif, on empêchera l'apparition des effets toxiques. Ce blocage est, le plus souvent, basé sur la propriété de certaines molécules à adsorber les toxines c'est à dire à se lier à celles-ci grâce à des liaisons non covalentes.

La Commission Européenne (EC), dans son règlement No 386/2009 du 12 mai 2009, a défini ces adsorbants comme un nouveau groupe fonctionnel d'additifs pour l'alimentation animale (European Commission, 2009). Il s'agit de substances ayant une grande affinité pour les aflatoxines et capables de diminuer leur disponibilité dans l'organisme. Les adsorbants sont en général des composés de poids moléculaire élevé et qui, dans l'intestin des animaux, sont capables de se lier aux aflatoxines empêchant donc leur absorption et entraînant leur excrétion fécale (Di Gregorio et al., 2014). L'efficacité du mécanisme d'adsorption dépend largement des propriétés physiques et de la structure de l'agent adsorbant ainsi que de la molécule adsorbée (taille, solubilité, polarité, taille des pores pour l'adsorbant, surface accessible et le cas échéant, la distribution des charges) (Huwig et al., 2001). On distingue plusieurs types d'adsorbants (minéraux, organiques et synthétiques) ainsi que plusieurs types d'interactions impliquées dans le phénomène d'adsorption. L'efficacité de différents adsorbants (charbon actif, bentonite, diatomite et Na-Ca-aluminosilicate hydraté/HSCAS) à lier *in vitro* l'AFB1 peut atteindre 99% à pH 7

pour une gamme de concentrations initiales en toxine comprise entre 0,8 et 20 $\mu\text{g/ml}$. Le **Tableau 8** présente les principaux adsorbants utilisés et leur efficacité à lier l'AFB1 *in vitro*.

Tableau 8. Efficacité d'adsorbants inorganiques à lier l'AFB1 dans des modèles *in vitro* du système gastro-intestinal

Adsorbant	Quantité d'adsorbant	pH	Niveau initial d'AFB1 ($\mu\text{g/ml}$)	Efficacité d'adsorption %	Références
Charbon actif	82 mg	7	0.821	>99%	(Gallo and Masoero, 2010)
Bentonite (Mg, Na, et Ca)	82 mg	7	0.821	>99%	(Gallo and Masoero, 2010)
Zéolite	82 mg	7	0.821	80%	(Gallo and Masoero, 2010)
Kaolinite	82 mg	7	0.821	57%	(Gallo and Masoero, 2010)
HSCAS	75 mg	6 et 8	20	100 et 98%	(Di Gregorio et al., 2014)
Montmorillonite	5, 10 et 100 mg	3 et 7	4	96-100%	(Dakovic et al., 2012)

Les zéolites sont moins efficaces avec une capacité de fixation de 80% de la quantité initiale de toxine. Ce potentiel d'adsorption se traduit *in vivo*, chez des volailles, par une réduction des taux d'AF dans le foie et des lésions hépatiques associées, une amélioration du gain de poids et de la productivité générale pour des concentrations initiales de toxines pouvant atteindre 500 $\mu\text{g/kg}$ (Di Gregorio et al., 2014). Cependant à des concentrations élevées proches de celles induisant des aflatoxicoses (2,5 mg/kg), les dommages hépatiques restent perceptibles malgré la réduction de la quantité de toxine absorbée dans l'organisme (Neeff et al., 2013). Les aluminosilicates (HSCAS) sont les adsorbants les plus efficaces pour réduire la disponibilité des aflatoxines. Ils ont aussi une certaine efficacité vis à vis d'autres mycotoxines. Cependant, dans le cas des multi-contaminations, il sera

probablement nécessaire d'utiliser plusieurs d'adsorbants, chacun pouvant être plus ou moins efficace en fonction de la nature des toxines cibles (Di Gregorio et al., 2014).

Ces adsorbants (aluminosilicates, bentonite, zéolite ou autres) peuvent aussi être ajoutés (1-10%) à des extraits de la membrane cellulaire de levures (90-99%) pour augmenter le rendement de ces derniers. Ils peuvent être ajoutés dans l'aliment des animaux ou bien être administrés directement à ces derniers par voie orale (Howes and Newman, 2000). Les LAB peuvent aussi détoxifier le milieu en liant les aflatoxines (Hamidi et al., 2013). Toutefois cette liaison reste réversible (Peltonen et al., 2001). D'autres composés naturels peuvent également agir comme des capteurs d'aflatoxines dans le tractus digestif. Par exemple, les polyphénols du thé vert (Wu, 2013) et la chlorophylline, un dérivé semi-synthétique de la chlorophylle, peuvent séquestrer les aflatoxines pendant la digestion et limiter ainsi leur absorption intestinale (Egner et al., 2001). Il reste maintenant à caractériser, pour ce type de composé, les doses efficaces et les modes d'administration les plus adaptés (Wu, 2013).

Malgré leur efficacité pour réduire l'absorption intestinale des aflatoxines dans l'alimentation animale, l'utilisation des adsorbants présente aussi des limites. Ainsi, leur usage est plus prophylactique que thérapeutique. De plus, l'excrétion fécale des aflatoxines piégées dans l'intestin pose la question du devenir des toxines ainsi libérées dans l'environnement et de leur possible désorption du capteur, ce qui pourrait entraîner un nouveau cycle de contamination de matières premières ou de l'eau.

F. Les extraits naturels de plantes : une stratégie alternative de lutte contre la contamination par les aflatoxines

La fréquence de contamination des récoltes mondiales par les aflatoxines montre que les stratégies utilisées actuellement sont insuffisantes pour garantir la sécurité des aliments et qu'il convient d'en développer d'autres, en complément ou substitution de celles existant déjà. Dans ce contexte, des stratégies basées sur l'usage de composés naturels, généralement reconnus comme non nocifs à l'environnement ainsi qu'à la santé, semblent intéressantes. En effet, les plantes produisent différents métabolites secondaires

(terpenoïdes, composés phénoliques, alkaloïdes, etc.) pour leur protection contre les agressions de toute sorte (mécanique, biologique ou climatique). Ces composés pourraient éventuellement être utilisés comme moyen de lutte contre une contamination fongique et/ou mycotoxique (Isman and Machial, 2006).

F.1. Les huiles essentielles

F.1.1. Généralités

Les huiles essentielles (HE) sont un mélange de composés volatils (métabolites secondaires) isolés des plantes essentiellement par hydro-distillation. Elles sont majoritairement constituées de mono- et sesquiterpènes mais peuvent aussi contenir des hydrocarbures non terpenoïdes, phenylpropanoïdes, esters, lactones, phthalides, des structures azotées ou sulfurisées et des isothiocyanates. Il s'agit de composés lipophiles qui se distinguent par leurs propriétés aromatiques, d'où leur utilisation comme arômes ou parfums (Chizzola, 2013). Par ailleurs, certains composés sont également utilisés pour leurs nombreuses activités biologiques: bactéricide, insecticide et fongicide (Isman, 2000).

F.1.2. Utilisation des huiles essentielles comme agents anti-aflatoxinogènes

À la vue de leurs différentes propriétés biologiques, les HE ont été testées comme stratégie alternative pour lutter contre les mycotoxines, et surtout les aflatoxines (Abd El-Aziz et al., 2015; Bluma et al., 2008; Kedia et al., 2014b; Paranagama et al., 2003; Rasooli et al., 2008; Tian et al., 2012). Les résultats de différentes études sont regroupés dans le **Tableau 9**. Ils montrent que de nombreuses huiles sont capables de bloquer la synthèse d'AFB1 mais, dans la plupart des cas, cette inhibition est liée à un ralentissement ou à une inhibition de la croissance fongique.

Tableau 9. Effet inhibiteur de quelques huiles essentielles sur la croissance d'*A. flavus* et la production d'AFB1

Huile essentielle	Concentration utilisée dans le milieu de culture	Inhibition de la croissance d' <i>A. flavus</i>	Inhibition de la production d'AFB1	Référence
Agérate (<i>Ageratum conyzoides</i>)	0,1 µg/ml	49%	100%	(Nogueira et al., 2010)
	0,04 µg/ml	30%	65%	
Anis (<i>Pimpinella anisum</i>)	0,5 µg/g	100%	100%	(Bluma et al., 2008)
Basilic (<i>Ocimum sanctum</i>)	0,1 µg/ml	72,5%	88,4%	(Kumar et al., 2010)
	0,2 µg/ml	90,1%	100%	
Basilic doux (<i>Ocimum basilicum</i>)	4% (v/v)	60%	52%	(Atanda et al., 2007)
Bétel (<i>Piper betle</i>)	0,4 µl/ml	26,7%	74,50%	(Prakash et al., 2010)
	0,6 µl/ml	77,8%	100%	
Callistemon (<i>Callistemon lanceolatus</i>)	0,546 mg/ml	79,6%	100%	(Shukla et al., 2012)
	0,819 mg/ml	100%	100%	
Cannelle (<i>Cinnamomum jensenianum</i>)	4 µl/ml	63%	84%	(Tian et al., 2012)
	6 µl/ml	84%	100%	
Cardamone (<i>Amomum subulatum</i>)	0,25 mg/ml	25%	69%	(Singh and Srivastava, 2008)
	0,5 mg/ml	74%	100%	
Cassia-Cannelle Chinoise (<i>Cinnamomum cassia</i>)	4% (v/v)	0%	96%	(Atanda et al., 2007)
Citronnelle (<i>Cymbopogon citratus</i>)	0,2 mg/ml	3%	100%	(Paranagama et al., 2003)
Coriandre (<i>Coriandrum sativum</i>)	0,75 µl/ml	66,5%	25%	(Deabes et al., 2011)
Cumin (<i>Cuminum cyminum</i>)	0,4 µl/ml	52%	67%	(Kedia et al., 2014b)
	0,5 µl/ml	91%	100%	
Curcuma (<i>Curcuma longa</i>)	0,5 % (v/v)	nd	99%	(Ferreira et al., 2013)
Fenouil (<i>Foeniculum vulgare</i>)	0,75 µl/ml	54,4%	23%	(Deabes et al., 2011)
Feuilles de Laurier (<i>Laurus nobilis</i>)	5% (v/v)	-36,4%	46%	(Atanda et al., 2007)
Menthe (<i>Mentha spicata</i>)	0,6 µl/ml	66,4%	50,2%	(Kedia et al., 2014a)
	0,9 µl/ml	84,9%	100%	
	0,3 µl/ml	50%	80%	
Palmarosa-Géranium des Indes (<i>Cymbopogon martinii</i>)	0,4 µl/ml	95%	100%	(Mishra et al., 2015)
Romarin (<i>Romarinus officinalis</i>)	0,45% (v/v)	0%	100%	(Rasooli et al., 2008)
Thym (<i>Thymus vulgaris</i>)	0,3 µl/ml	46,9%	75,6%	(Kumar et al., 2008)
	0,7 µl/ml	100%	100%	
Verveine (<i>Lippia rugosa</i>)	600 µg/ml	5%	61%	(Tatsadjieu et al., 2009)
	1000 µg/ml	5%	100%	

La caractérisation de plusieurs HE a été effectuée par GC/MS et les composés actifs responsables de leur activité anti-toxinogène ont été identifiés et caractérisés. Les principaux composés communs à la plupart des HE anti-aflatoxinogènes incluent : eugénol, thymol, carvacrol, menthol, eucalyptol, carvone, linalool, etc. Dans le **Tableau 10** sont rapportées les concentrations de ces différents composés capables de bloquer la croissance et/ou la production d'AFB1 chez *A. flavus*. (Abbaszadeh et al., 2014; Chulze, 2010; Kedia et al., 2016, 2014a; Omidbeygi et al., 2007).

Tableau 10. Effet de 4 composés actifs majeurs des HE sur la croissance d'*A. flavus* PTCC 5004 (Abbaszadeh et al., 2014) et la production de l'aflatoxine B1 sur milieu SDA (Sabouraud Dextrose Agar) après 7 jours d'incubation à 35°C

	MFC (µg/ml)	MIC (µg/ml)
Carvacrol	125	100
Eugénol	500	450
Menthol	125	100
Thymol	150	125

MIC = Concentration minimale inhibitrice de l'AFB1; MFC = Concentration minimale fongistatique

Les HE sont des molécules d'origine naturelle, biodégradables, et sont donc considérées comme une alternative possible aux pesticides (Kedia et al., 2015). Leur utilisation en tant qu'additifs ou arômes alimentaires a d'ailleurs été récemment autorisée aux Etats Unis (Food and Drug Administration, 2013). Comme leurs composants actifs sont hautement volatils, elles sont principalement utilisées comme agents de fumigation des produits agricoles après la récolte. Un certain nombre d'huiles essentielles commercialisées peuvent être ainsi utilisées dans les cultures produites selon le cahier des charges de l' « Agriculture Biologique » tels E-Rase™ (HE de jojoba, *Simmondsia californica*), Sporan™ (HE de romarin, *Rosemarinus officianalis*), Promax™ (HE de thym, *Thymus vulgaris*) (Dayan et al., 2009), Cinnamite™ et Valero™ (HE de cannelle) (Isman, 2000), Talent® (à base de carvone, HE de cumin ou d'aneth) et eugenol-Tween® (Prakash et al., 2015).

F.1.3. Mécanisme d'action cellulaire des huiles essentielles

Le mécanisme d'action des HE au niveau cellulaire n'est toujours pas clairement élucidé. Cependant, plusieurs cibles cellulaires potentielles ont été identifiées. Composées de plusieurs types de molécules bioactives, les huiles essentielles peuvent agir simultanément sur plusieurs cibles cellulaires. Cette action pourrait se situer au niveau de la membrane plasmique ou bien au niveau d'enzymes intracellulaires (**Figure 15**) (Kedia et al., 2015; Kim et al., 2006; Prakash et al., 2012; Tatsadjieu et al., 2009).

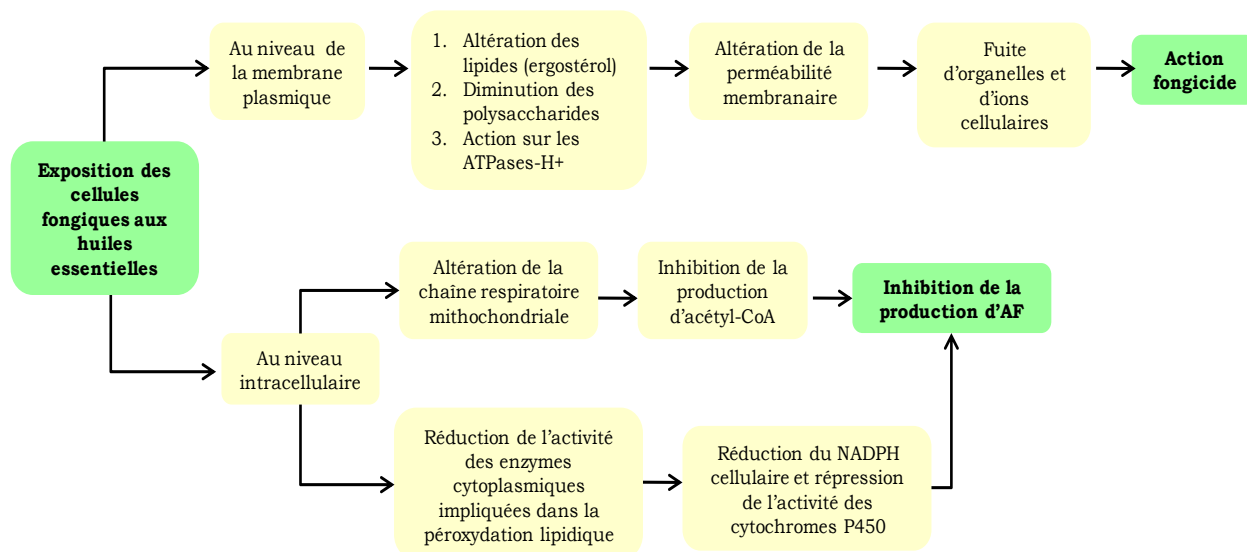


Figure 14. Diagramme représentant les modes d'action cellulaires hypothétiques des huiles essentielles

F.1.3.1. Altération des mécanismes membranaires

La nature hydrophobe des constituants des HE facilite leur incorporation aux membranes plasmiques et à celles des organites intracellulaires (notamment la mitochondrie). Ces composés peuvent alors agir en altérant la composition lipidique membranaire. Ils sont souvent associés à une diminution des taux d'ergostérol (Kedia et al., 2015; Prakash et al., 2015). Ce dernier est un lipide membranaire et constituant majeur de la membrane cellulaire fongique, essentiel à l'intégrité de cette dernière et au développement des champignons (Barrett-Bee and Dixon, 1995). La déstructuration de la paroi de la cellule peut également avoir lieu en agissant sur les polysaccharides

membranaires (galactose et galactosamine) (Tatsadjieu et al., 2009). Ces déséquilibres membranaires entraînent une fuite des organites et des ions nécessaires à la survie des cellules fongiques. Kedia et al. (2016) ont ainsi observé des anomalies morphologiques liées à la rupture de la membrane plasmique et la fuite des ions Ca^{2+} , K^{+} , and Mg^{2+} des cellules d'*A. flavus* se développant sur des pois chiches traités par fumigation avec de l'HE de menthe (*Mentha spicata*).

Certaines HE peuvent également agir au niveau des ATPase- H^{+} membranaires, essentielles pour le maintien d'un équilibre osmotique en régulant la concentration d'ions intracellulaires. En effet, afin de permettre le transport des molécules de glucose à l'intérieur de la cellule, ces ATPases pompent des protons H^{+} vers le milieu extracellulaire. Cette activité est évaluée en mesurant le pH du milieu extracellulaire. L'étude de Tatsadjieu et al. (2009) a démontré l'inhibition dose-dépendante de l'acidification du milieu extracellulaire par l'huile essentielle de verveine en lien avec la modulation de la croissance d'*A. flavus*.

F.1.3.2. Altération d'enzymes des métabolismes glucidique et lipidique

Les composants bioactifs des HE peuvent aussi agir au niveau enzymatique sur des mécanismes directement impliqués dans la production des aflatoxines tels le catabolisme du glucose et la peroxydation lipidique.

En effet, lors d'un développement sur un milieu contenant du glucose, la plupart des champignons utilise ce dernier pour produire de l'énergie par respiration mitochondriale oxydative. Le glucose entrant dans la cellule est métabolisé en pyruvate dans le cytoplasme et ce dernier est transformé en acétyl-CoA, au niveau de la membrane mitochondriale (Strijbis and Distel, 2010). Il a été démontré que l'activité anti-toxinogène des composés phénoliques, constituants, entre autres, des HE, est associée à une inhibition de l'activité de MnSOD (ou Sod2), une superoxyde dismutase mitochondriale qui a pour rôle de détoxifier des radicaux libres générés au cours de cette respiration (Kim et al., 2006, 2004). Ce phénomène entraîne l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale et, par la suite, le blocage de la synthèse d'acétyl-CoA, précurseur de l'aflatoxine. Ceci pourrait donc

contribuer à l'effet anti-aflatoxinogène observé des HE (Prakash et al., 2012). L'eugénol inhibe également l'activité d'enzymes intervenant dans le catabolisme du glucose (glucose-6-phosphate dehydrogenase) ainsi que d'autres enzymes cytoplasmiques impliquées dans la peroxydation lipidique, réduisant ainsi le stress oxydant, un prérequis pour la production d'aflatoxines (Jayashree and Subramanyam, 2000, 1999). Ces mécanismes d'action ne sont toutefois pas encore clairement décrits et n'ont pas encore été liés aux différents mécanismes intervenant dans la régulation de la biosynthèse d'aflatoxines au niveau transcriptomique.

F.1.4. Limitations de l'utilisation des huiles essentielles

Bien que l'utilisation des huiles essentielles en fumigation sur des grains en stockage puisse constituer une stratégie intéressante, elle se heurte à plusieurs contraintes :

- i) Phytotoxicité : L'altération de l'intégrité de la membrane cellulaire suite à l'exposition aux HE (responsable de leur effet anti-fongique) pourrait aussi affecter les plantes et induire une phytotoxicité à des concentrations légèrement plus élevées que celles utilisées pour lutter contre les champignons (Isman and Machial, 2006). Il convient également de souligner que les HE les plus efficaces sont généralement les plus phytotoxiques (Isman, 2000).
- ii) Toxicité pour les mammifères : une exposition à des huiles essentielles ou bien à leurs composants peut-être toxique pour les mammifères. Hartnoll et al., (1993), ont reporté un cas d'ingestion de 5 ml d'huile essentielle de clou de girofle chez un enfant qui a entraîné une hépatotoxicité sévère et un coma. L'huile essentielle d'hysope pourrait induire une neurotoxicité (crises épileptiques) lors d'inhalation excessive, due à sa forte teneur en cétones (40% pinocamphone et 30% iso-pinocamphone) (Tisserand and Young, 1996). D'autres effets toxiques des HE ont été rapportés comme, par exemple, une photosensibilisation entraînant des irritations dermiques et des brûlures lors d'exposition à la lumière (HE avec une teneur élevée de furanocoumarins) (Tisserand, 1997). Le linalool, présent dans les HE de thym et de lavande est également toxique pour des cellules dermique humaines (Prashar et al., 2004).

- iii) Volatilisation rapide : Les composés des HE sont hautement volatiles et peuvent également se dégrader par oxydation suite à une exposition à la lumière ou une élévation de température. Cette perte d'activité nécessiterait donc leur réintroduction de manière continue pour maintenir l'effet protecteur (Kedia et al., 2015).
- iv) Altération des qualités organoleptiques : Les HE sont constituées de substances aromatiques et sont souvent utilisées en industrie cosmétique pour leur odeur agréable. Leur application sur des aliments pourrait en changer les qualités organoleptiques et altérer le goût de ces derniers (Kumar et al., 2010).

F.2. Les extraits aqueux de plantes médicinales

Les plantes médicinales, souvent commercialisées sous forme séchée, sont le plus communément consommées après une simple infusion dans de l'eau bouillante. Malgré leurs nombreuses vertus théoriques, peu d'études se sont attachées à la caractérisation de ces extraits aqueux et l'exploration de leur potentiel antifongique ou anti-toxinogène. Ces extraits aqueux sont, en effet, riches en composés phénoliques totaux et présentent souvent une activité anti-oxydante (Skotti et al., 2014). Une étude récente de Omidpanah et al. (2015), est l'une des rares à caractériser l'effet de 5 plantes médicinales sur la croissance d'*A. flavus* et la production d'AFB1 (**Tableau 11**).

Tableau 11. Concentrations minimales fongicides (MFC) après culture d'*A. flavus* 48h (25°C) sur un milieu PDA (Potato Dextrose Agar) supplémenté par des extraits aqueux de plantes médicinales.

Extrait aqueux	MFC (µg/ml)
Thym - <i>Thymus vulgaris</i>	200
Safran - <i>Carthamus tinctorius</i>	400
Séné - <i>Cassia senna</i>	600
Basilic - <i>Ocimum basilicum</i>	800
Menthe- <i>Mentha pulegium</i>	800

Les extraits aqueux de plantes possèdent donc potentiellement des activités fongistatiques importantes vis-à-vis d'*A. flavus*. Ces dernières sont d'ailleurs globalement

similaires à celles observées avec les composés des HE. Ainsi, si on compare l'efficacité de certains extraits aqueux et des huiles essentielles correspondants, on peut noter que :

- La MFC du thymol, monoterpène constituant majeur de l'HE de thym - *Thymus vulgaris* (28%) (Sarikurkcu et al., 2010) est de 150 µg/ml alors que celle de l'extrait aqueux de thym est assez proche (légèrement supérieure), à 200 µg/ml.
- L'HE du basilic - *Ocimum sanctum* est constitué à 61% d'eugénol (Kumar et al., 2010). La MFC de ce dernier est de 500 µg/ml et celle de l'extrait aqueux de basilic est de 800 µg/ml.

Par conséquent, il semblerait intéressant d'explorer plus avant le potentiel anti-aflatoxinogène de ces extraits aqueux car ils peuvent présenter plusieurs avantages sur les HE:


- i) toxicité probablement négligeable ou très réduite comparée à celle des HE, notamment lors d'exposition par voie orale
- ii) pas de modifications organoleptiques des aliments car leurs taux en composés volatils fortement aromatiques sont beaucoup plus faibles (Skotti et al., 2014).

Cependant, il est évident que l'application directe d'extraits aqueux sur des grains préalablement séchés peut être problématique. Il semble donc nécessaire de développer, en parallèle, des formulations adaptées à leur utilisation au cours du stockage des matières premières agricoles.

Néanmoins, à l'heure actuelle, les données concernant l'efficacité de tels extraits et la nature des composés bioactifs qu'ils contiennent ne sont encore que très limitées.

Travail Expérimental

**Chapitre 1- Développement et validation d'un outil
d'étude du mécanisme d'action moléculaire de
composés anti-aflatoxinogènes**



A. Introduction

Comme il a été décrit dans la première partie de ce manuscrit, certains extraits naturels présentent des effets inhibiteurs vis-à-vis d'*A. flavus*. Ils peuvent agir en limitant le développement fongique et donc la production de toxines, mais ils peuvent aussi inhiber la synthèse toxique sans altérer la croissance fongique. Dans ce cas, cette inhibition de la production de toxine a été associée à une réduction de précurseurs acétyl-CoA indispensables pour la production d'aflatoxines, ainsi qu'à une réduction de l'activité des enzymes intervenant dans la peroxydation lipidique et la réponse au stress oxydant. Cependant, le lien entre ces mécanismes physiologiques observés et leurs conséquences sur l'expression des différents gènes impliqués dans la cascade métabolique conduisant à la synthèse des mycotoxines est très peu documenté.

Dans le but de caractériser le mécanisme d'action moléculaire d'extraits naturels inhibiteurs de l'aflatoxinogénèse chez *A. flavus*, nous nous sommes attachés à développer un outil moléculaire permettant d'analyser l'impact de ces extraits sur l'expression de plusieurs familles de gènes impliqués directement et/ou indirectement dans la voie de biosynthèse de l'aflatoxine B1 (AFB1). Cet outil regroupe ainsi les 27 gènes du cluster des aflatoxines directement responsables de la production d'AFB1 dont les deux régulateurs principaux de ce cluster : le facteur de transcription AflR et son co-activateur AflS. Il inclut aussi un certain nombre d'autres gènes, impliqués indirectement dans la synthèse de la toxine. En effet, la biosynthèse de l'AFB1 est aussi dépendante de l'action de gènes intervenant dans le développement fongique et pouvant jouer un rôle dans la morphologie, la conidiogénèse, la sporulation et la formation de sclérotés ainsi que des gènes appartenant à la famille velvet et régulant de façon globale le métabolisme primaire et secondaire. La voie de biosynthèse est également influencée par des gènes qui sont eux mêmes activés en réponse à des stimuli environnementaux (carbone, pH, azote, etc.). De plus, cette voie peut être également modulée par des gènes codant pour des médiateurs cellulaires appartenant aux voies Ras, G-protéines ou oxylipines. En se basant sur les données bibliographiques disponibles et décrivant les relations possibles entre ces différents processus physiologiques, les gènes impliqués et la production d'AF chez *A.*

flavus et *A. parasiticus* ou celle de la sterigmatocystine chez *A. nidulans*, 33 gènes ont été sélectionnés et ajoutés aux gènes du cluster afin d'obtenir un outil permettant l'analyse simultanée de l'expression de 60 gènes lors de l'exposition à un composé anti-aflatoxinogène.

Afin de valider la conception de cet outil, nous l'avons utilisé pour caractériser le mode d'action d'une molécule anti-aflatoxinogène déjà identifiée: l'eugénol. Cette molécule est un constituant important de plusieurs plantes dont le clou de girofle. Elle est connue pour ses effets biologiques nombreux et variés (antimicrobien, anti-oxydant, anticancéreux, anti-inflammatoire) (Kamatou et al., 2012). Des études antérieures avaient démontré que l'eugénol était capable de moduler négativement la synthèse d'AFB1 chez *A. flavus* (Jayashree et al., 1999). Cet effet anti-aflatoxinogène avait été associé à une diminution de la peroxydation lipidique mais l'analyse du mécanisme moléculaire à la base de cet effet s'était restreint à quelques gènes appartenant à la voie de biosynthèse chez *A. parasiticus* (Jahanshiri et al., 2015).

Notre travail a donc visé à caractériser l'effet dose-dépendant de l'eugénol sur la croissance d'*A. flavus* ainsi que sur la production d'AFB1.

Nous avons ensuite analysé l'impact de cette molécule, à une concentration inhibant la synthèse de la toxine mais n'ayant pas d'effet sur la croissance, sur l'expression des 60 gènes inclus dans notre outil moléculaire.

Ces travaux ont permis de montrer que l'effet de l'eugénol sur la synthèse de l'AFB1 est lié à une régulation négative de l'expression des gènes du cluster de l'AFB1 liée à une inhibition de l'expression d'*aflR* et *aflS*. Nous avons aussi démontré que cet effet était en lien avec l'impact de l'eugénol sur l'expression d'autres facteurs régulateurs du métabolisme secondaire et en particulier VeA, MtfA et MsnA.

B. Article publié: Deciphering the anti-aflatoxinogenic properties of eugenol using a large-scale qPCR approach, *Toxins* 8 (5), 123.



Article

Deciphering the Anti-Aflatoxinogenic Properties of Eugenol Using a Large-Scale q-PCR Approach

Isaura Caceres^{1,†}, Rhoda El Khoury^{1,2,†}, Ángel Medina³, Yannick Lippi¹, Claire Naylies¹, Ali Atoui⁴, André El Khoury², Isabelle P. Oswald¹, Jean-Denis Bailly^{1,*} and Olivier Puel¹

¹ Toxalim, Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP Purpan, UPS, Toulouse, France;

isauracaceres@hotmail.com (I.C.); rhodakhoury@gmail.com (R.E.K.); yannick.lippi@toulouse.inra.fr (Y.L.); claire.naylies@toulouse.inra.fr (C.N.); ioswald@toulouse.inra.fr (I.P.O.); olivier.puel@toulouse.inra.fr (O.P.)

² Laboratoire de Mycologie et Sécurité des Aliments (LMSA), Département de Biochimie, Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph, P.O. Box 11-514, Beirut 1107 2050, Lebanon; andre.khoury@usj.edu.lb

³ Applied Mycology Group, School of Energy, Environment and AgriFood, Cranfield University, Cranfield MK43 0AL, Bedfordshire, UK; a.medinavaya@cranfield.ac.uk

⁴ Laboratory of Microbiology, Department of Natural Sciences and Earth, Faculty of Sciences I, Lebanese University, Hadath Campus, P.O. Box 11-8281, Beirut, Lebanon; a.atoui@cnrs.edu.lb

* Correspondence: jd.bailly@envt.fr; Tel.: +33-56-1193-229

† These authors contributed equally to this work.

Academic Editor: Shohei Sakuda

Received: 31 March 2016; Accepted: 18 April 2016; Published: 26 April 2016

Abstract: Produced by several species of *Aspergillus*, Aflatoxin B₁ (AFB₁) is a carcinogenic mycotoxin contaminating many crops worldwide. The utilization of fungicides is currently one of the most common methods; nevertheless, their use is not environmentally or economically sound. Thus, the use of natural compounds able to block aflatoxinogenesis could represent an alternative strategy to limit food and feed contamination. For instance, eugenol, a 4-allyl-2-methoxyphenol present in many essential oils, has been identified as an anti-aflatoxin molecule. However, its precise mechanism of action has yet to be clarified. The production of AFB₁ is associated with the expression of a 70 kB cluster, and not less than 21 enzymatic reactions are necessary for its production. Based on former empirical data, a molecular tool composed of 60 genes targeting 27 genes of aflatoxin B₁ cluster and 33 genes encoding the main regulatory factors potentially involved in its production, was developed. We showed that AFB₁ inhibition in *Aspergillus flavus* following eugenol addition at 0.5 mM in a Malt Extract Agar (MEA) medium resulted in a complete inhibition of the expression of all but one gene of the AFB₁ biosynthesis cluster. This transcriptomic effect followed a down-regulation of the complex composed by the two internal regulatory factors, AflR and AflS. This phenomenon was also influenced by an over-expression of *veA* and *mtfA*, two genes that are directly linked to AFB₁ cluster regulation.

Keywords: Aflatoxin B₁; *Aspergillus flavus*; aflatoxinogenesis; molecular tool; gene regulation; eugenol

1. Introduction

Aflatoxin B₁ (AFB₁) is a mycotoxin produced by many fungal species belonging to the *Flavi* section of the *Aspergillus* genus, *A. flavus* being the most preoccupying species [1]. AFB₁ is the most potent naturally occurring carcinogen [2], responsible for hepatocarcinoma; it is also an immunosuppressive agent and has been linked to growth impairment in children [3,4].

AFB₁ is problematic in countries with tropical and sub-tropical climates where temperature and humidity conditions are optimal for fungal growth and toxin production [5]. However, this danger has spread beyond its predicted geographical borders and has reached countries previously considered as safe. In fact, in recent years, several surveys demonstrated the contamination of European crops by this

toxin [6,7]. Fungal infection can occur at a pre- or post-harvest stage of cereal production, especially corn, but also oilseeds, nuts, spices and dried fruit [8].

Many strategies have been developed to reduce AFB₁ contamination, either by preventing the fungal development or by blocking the toxin's production after infection [9]. Natural extracts are considered as a possible alternative antimicrobial agent [10]. Indeed, organic and aqueous extracts from plants and spices, as well as essential oils, have demonstrated fungicidal and/or anti-toxinogenic properties [11–13]. For example, eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol), the active compound of many anti-toxinogenic essential oils [14,15], blocks AFB₁ production in aflatoxigenic fungi [16,17]. However, little is known about the molecular mechanism of this inhibition and the fungal pathways affected by eugenol remain to be determined.

AFB₁'s biosynthetic pathway is well characterized and consists in *A. flavus*, of a cluster of 27 genes whose expression is governed by two internal regulators (AflR and AflS). AFB₁'s biosynthesis is also interconnected with developmental genes that play a role in morphology, conidiation, or sclerotia formation [18,19], as well as genes encoding the velvet regulating proteins that coordinate primary and secondary metabolism (SM) [20]. Transcription factors (TFs) such as *mtfA* [21] and *fcr3* (*A. nidulans rsmA* orthologous) [22] and other TFs influenced by environmental factors like pH, nitrogen and carbon, can also interfere with aflatoxin production [23]. In the same way, genes related to oxidative stress regulation [24] as well as genes encoding cellular signal mediators such as *rasA*, [25] G-protein receptors [26] and oxylipins' biosynthetic genes [27] influence toxin synthesis. This demonstrates the complexity of environmental signals and cellular pathways involved or interfering with mycotoxin production.

In the present study, a molecular tool was developed including genes directly implicated in aflatoxin production as well as genes involved in the upstream regulation of this toxin. This tool was used to determine the molecular mechanism of AFB₁'s inhibition by eugenol. Hence, we demonstrate that this later compound acts at the transcriptomic level to inhibit AFB₁ production by restricting the expression of its biosynthetic cluster. Moreover, we also reveal that this inhibition is mainly governed by the modification of *mtfA* and *veA*'s expression levels.

2. Results

2.1. Effect of Eugenol on Fungal Growth and Aflatoxin B₁ Production

Five different concentrations of eugenol were tested for their effect on both fungal development and AFB₁ biosynthesis (Figure 1). Fungal growth was only slightly affected and colony diameter was reduced by 11.4% for 0.5 mM and 34.5% for 1 mM eugenol. By contrast, eugenol decreased AFB₁ production in a dose-dependent manner with inhibitions of 19.8, 30.9, 70.2 and 100% at eugenol concentrations of 0.01, 0.05, 0.1 and 0.5–1 mM, respectively.

For subsequent assays, a concentration of 0.5 mM of eugenol was used allowing complete inhibition of AFB₁ production with a limited impact on fungal growth. Since AFB₁ production can be modulated by pH, this parameter was measured in the fungal cultures. Before incubation, pH values were 5.30 ± 0.06 and 5.23 ± 0.08 in control and treated cultures, respectively. After four days at 27 °C, both cultures displayed a mild but statistically significant (p -value = 0.049) acidification with pH means \pm Standard Error of Mean (SEM) of 4.7 ± 0.03 for control and 4.4 ± 0.2 for eugenol treated cultures.

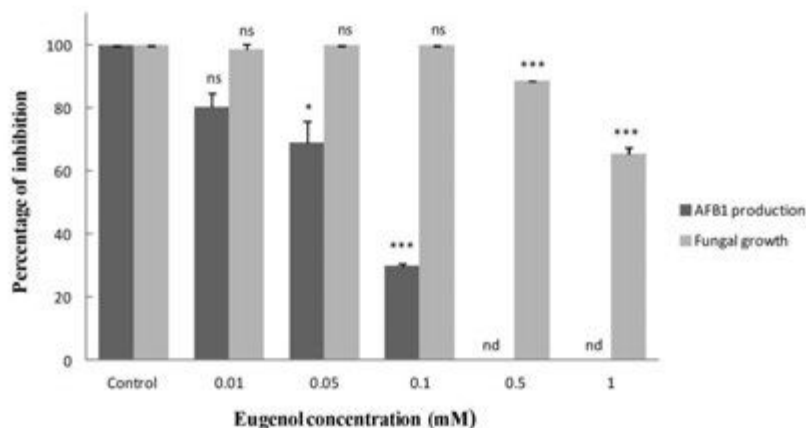


Figure 1. Effect of eugenol on Aflatoxin B₁ (AFB₁) production and fungal growth in *A. flavus* NRRL 62477. Results are expressed as percentage of the control value. AFB₁ was estimated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and fungal growth by colony diameter. Both measures were taken on day 4 on six biological replicates. ns = no significant changes; nd = not detectable; * *p*-value < 0.05; *** *p*-value < 0.001.

2.2. Effect of Eugenol on Aflatoxin Biosynthetic Pathway

In *A. flavus*, AFB₁'s biosynthetic pathway consists of 27 genes regrouped in a cluster where *aflR* and *aflS* are the two internal regulators. Following the addition of 0.5 mM eugenol, AFB₁ was completely inhibited and all cluster genes with the exception of *aflT* (*p*-value = 0.8667) were strongly down-regulated. In fact, the expression of 19 out of 27 genes was almost completely inhibited, whereas five others had 10- to 20-fold reductions in expression levels compared to control conditions (Figure 2). Therefore, the extent of down-regulation was mildly different according to the chronological intervention level of the encoded enzyme in the biosynthetic pathway.

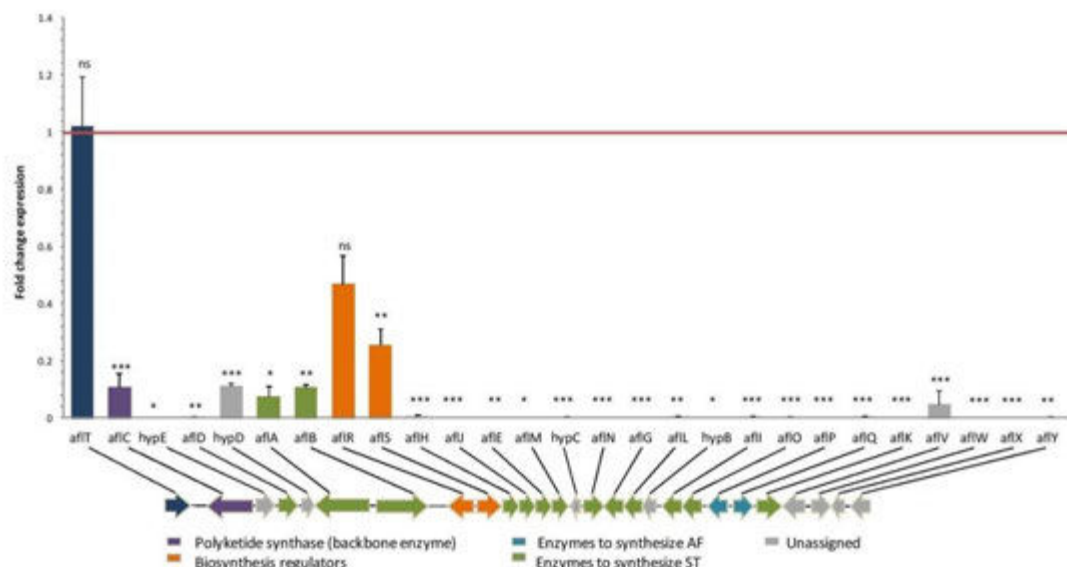


Figure 2. Fold change expression of genes belonging to the cluster responsible for aflatoxin biosynthesis in response to eugenol at 0.5 mM. Red line represents control expression level. Gene cluster organization was adapted from Amaike and Keller [1]; ns = no significant changes; * *p*-value < 0.05; ** *p*-value < 0.01;

As an illustration, fundamental genes involved in the first steps of AFB₁'s enzymatic cascade, such as *aflC*, encoding the polyketide synthase A, and two of fatty acid synthase genes *aflA* (*fas-2*) and *aflB* (*fas-1*), appeared less affected by eugenol compared to further intermediate genes such as *aflO* (*omtB*), *aflP* (*omtA*) and *aflQ* (*ordA*), the latter being an enzyme in charge of the final transformation of AFB₁. For those genes, expression was almost completely inhibited by eugenol (*p*-values < 0.0001).

The reduced expression of cluster genes went with a decreased expression of the internal regulators. Concerning *aflS*, it saw a 3.9-fold down-regulation (*p*-value = 0.0030) whereas *aflR*'s expression level was not significantly affected by eugenol addition (*p*-value = 0.0522), although a diminution averaging at half was observed.

2.3. Effect of Eugenol on Regulatory Factors Linked to AFB₁ Production

Since AFB₁ biosynthesis is strongly interconnected with several other fungal biosynthetic pathways, a large number of genes considered as regulatory factors were analyzed. They included the velvet complex, genes involved in oxidative stress response, environmental and global transcription factors, genes involved in cellular signaling (oxylipins, Ras family and G-protein signaling and receptors) and developmental regulators (Figure 3).

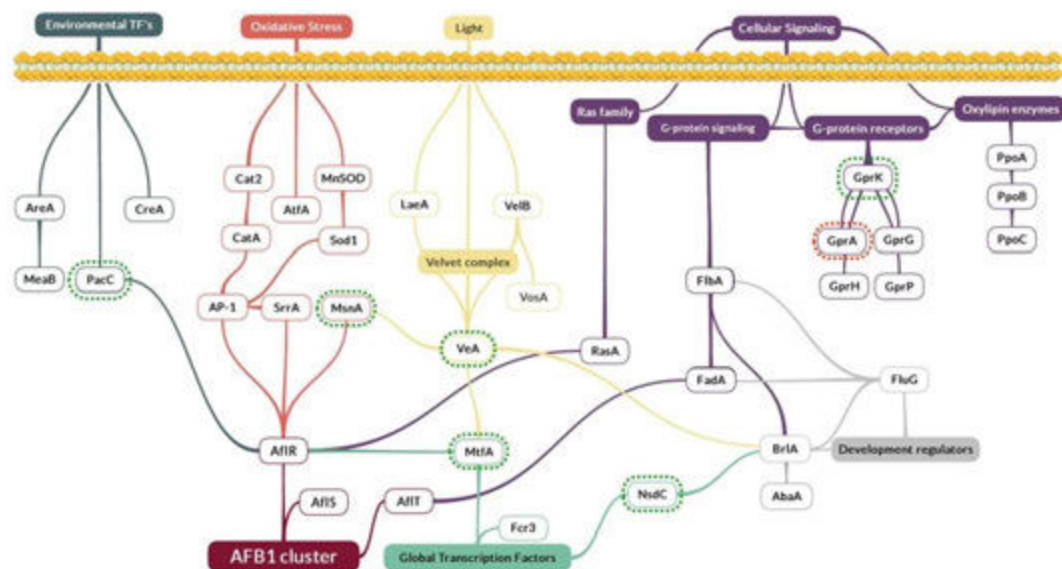


Figure 3. Schematic representation of the 33 selected regulatory factors linked to AFB₁ cluster in *A. flavus*. This hypothetical schema represents a simplified version of the different interactions between the regulatory factors and Aflatoxin's cluster. Schema was constructed based on gene interaction data described by the following works: [10,19–24,26,28–38]. Up- or down-regulation of genes upon eugenol addition is represented by green and red dotted lines, respectively.

As shown in Figure 4, among the 33 tested genes, only seven presented significant modifications of their level of expression upon eugenol exposure.

These genes were:

- The global regulator gene *veA*, belonging to the velvet complex. It was over-expressed with a 3.8-fold change compared to the control (*p*-value = 0.002);
- *mtfA*, a putative C₂H₂ zinc finger transcription factor. It presented the same up-regulated pattern, increasing its expression by 2.2 times (*p*-value = 0.0297);
- *nsdC*, of the global transcription factors, whose expression was increased by 1.7 times (*p*-value = 0.0100);

- *gprK*, which was the most affected gene among the five G-protein coupled receptors analyzed here. This gene was over-expressed by 4.5 times (p -value = 0.0009). By contrast, *gprA* was down-regulated by 0.45 times (p -value = 0.0177);
- The *msnA* gene was increased by 1.9 times (p -value < 0.0001), whereas no significant changes were observed for other genes implicated in the oxidative stress response such as superoxidase dismutases, catalases or oxylipins;
- Finally, *pacC*'s expression, a zinc finger transcription factor related to pH, was increased by 2.3 times (p -value = 0.0098).

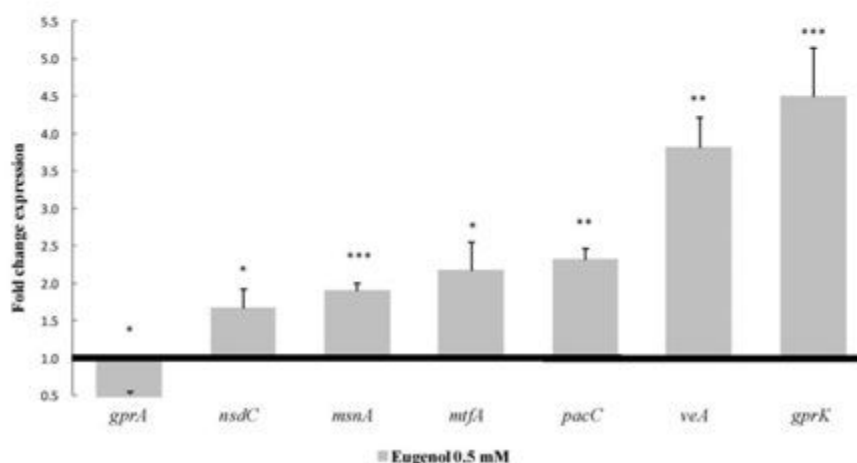


Figure 4. Fold change levels of the seven affected regulatory factors in presence of eugenol at 0.5 mM. Baseline represents control expression level; * p -value < 0.05; ** p -value < 0.01; *** p -value < 0.001.

3. Discussion

A number of natural extracts were identified as being able to down-modulate the synthesis of the carcinogenic mycotoxin AFB₁ in *A. flavus* [39]. The use of such inhibiting compounds could therefore represent an alternative strategy to the use of pesticides to control crop contamination. However, to date, the precise molecular mechanism responsible for this effect is only poorly documented. Indeed, mycotoxin production is a complex phenomenon based on the presence of biosynthetic clusters in toxigenic fungi whose regulation is governed by many environmental and physiological processes.

In order to better understand the inhibition of AFB₁ production by such natural extracts, we developed a molecular tool allowing the simultaneous analysis of the expression of both the AFB₁ cluster and a large number of global regulatory genes involved in different cellular pathways. We used it to characterize the mechanism of action of eugenol, a compound present in many essential oils and that has been previously identified as an AFB₁ inhibitor. Eugenol has been extensively studied for its many biological effects including antimicrobial, anti-inflammatory, anti-oxidant and anticancer activities. However, to date, no precise cellular target was identified even though the interaction with cell membrane may represent a key point in the biological effects of this molecule [40].

3.1. Eugenol Inhibits the Expression of Aflatoxin Cluster Genes in *A. flavus*

The inhibition of AFB₁ production by a toxigenic strain of *A. flavus* following eugenol addition is accompanied by the down-regulation of all but one aflatoxin cluster genes.

We demonstrated that the expression of 19 out of 27 genes of the cluster was almost no more detectable after eugenol exposure, whereas the others saw 10- to 20-fold reductions in their expression levels. These results are coherent with a very recent work of Jahanshiri *et al.* [16] showing that eugenol decreased the expression of some of Aflatoxins (AF)'s cluster genes in *A. parasiticus*. In that previous

study, only five genes of the pathway were analyzed. Our present work extended this finding to the whole genes involved in the biosynthesis of AFB₁.

AFB₁'s cluster is internally regulated by two genes, *aflR* and *aflS*, whose activation is governed, independently one from another, by external regulators. An interaction between AflR and AflS is reportedly required for aflatoxinogenesis [41]. Kong *et al.* [42] reported that the activation by these two proteins led to the formation of a functional activation complex in the proper ratio of four AflS to one AflR. In our study, the expression of *aflR* was not significantly decreased in cultures exposed to eugenol, although a major down-regulation tendency was observed. Such a finding was already described in several studies where even low-level changes of *aflR*'s expression levels were accompanied by a severe decrease of structural genes [25,43,44]. However, levels of *aflS* transcripts were significantly reduced, which might have led to an alteration of the ratio between AflR and AflS and thus the formation of a limited number of active complexes. Consequently, AflR-binding sites were not attained and the transcription of the cluster was not activated (Figure 2). All of the cluster genes regulated by *aflR* had their expression levels severely decreased by eugenol's addition. The genes intervening in the later stages of AFB₁'s enzymatic cascade (*aflM*, *aflN*, *aflX*, *aflO*, *aflP*, *aflQ* and *hypB*) were more impacted than those involved in the beginning stages (*aflA*, *aflB*, *aflC*) leading to the polyketide structure [45]. The limited AflR/AflS complexes formed might have been promptly used up at the beginning of AFB₁'s synthesis and were no longer sufficiently available for the proper activation of the rest of the cluster genes.

For *aflT*, the expression levels were not significantly different between control and eugenol-treated cultures. In fact, *aflT*, a Major Facilitator Superfamily (MFS) transporter encoding gene, is regulated neither by AflR nor by its co-activator AflS, due to the absence of an AflR binding-site on its promoter, but rather by the FadA-dependent G-protein signaling pathway [46]. Moreover, the expression of none of the genes belonging or affected by the latter pathway, notably *fadA*, *flbA*, *fluG* and *brlA* [34], has been altered by eugenol's addition (Table S1).

3.2. Eugenol Alters the Expression of Global Regulation Factors

Eugenol's transcriptomic effect goes upstream of AF's cluster genes, affecting genes encoding general transcriptional regulating factors.

3.2.1. The Pivotal Role of MtfA, VeA and MsnA in Eugenol's Molecular Mechanism

MtfA is a global transcription factor, regulating sterigmatocystin/aflatoxin biosynthesis as well as other secondary metabolites clusters [31]. The deletion as well as the over-expression of *mtfA* has been shown to inhibit the expression of *aflR* and subsequent sterigmatocystin production in *A. nidulans* [21]. Also, in the recent work of Zhuang *et al.* [47] on peanut seeds infected with Δ *mtfA* and over-expressed (OE) *mtfA* gene on *A. flavus* strains, it was observed that the decrease in AFB₁ production was greater when there was a 2.75-fold *mtfA* over-expression compared to the wide-type strain, than deleted, and went with a decreased expression of *aflR*. Although the *mtfA* gene is over-expressed at a similar level as in the above-quoted study [47], this does not mean that MtfA is the direct molecular target of eugenol. A kinetic study of gene expression, using our molecular tool coupled to AF production analysis, could be used in order to determine the time course evolution of modulated genes.

Furthermore, *mtfA*'s expression is highly dependent on that of *veA*. As discussed in the study by Lind *et al.* [31], MtfA interacts with VeA in *A. nidulans* and the expression of *mtfA* (AN8741.2) was decreased by 5 times in an *A. nidulans* Δ *veA*. All of the above findings are in favor of the notion that the over-expression of *mtfA* in *A. flavus* is a result of the increased expression of *veA* upon eugenol addition. The interaction of these two regulators could then be responsible for *aflR*'s down-regulation and the succeeding inhibition of AF's biosynthetic pathway in *A. flavus*. Moreover, VeA is by itself essential for the transcription of both *aflR* and *aflS* and, consequently, the production of aflatoxins [48]. This global transcription regulator plays a key role in secondary metabolite production [49]. Depending on its abundance in the cell, it may act as a repressor or as an activator [50]. For instance, the expression

of fumagillin and fumitremorgin G gene clusters was inhibited in a overexpressing *veA* (OE:*veA*) strain of *A. fumigatus* [51]. Therefore, an over-expression of *veA* (3.8-fold) observed here is compatible with the down-regulation of *aflR* and *aflS* and the subsequent inhibition of aflatoxin production in eugenol-treated cultures. Furthermore, as in many filamentous fungi, SM, and aflatoxin production in particular are often induced as a response to Reactive Oxygen Species (ROS) formation [52]. It has been also demonstrated that VeA plays a critical role in protecting *A. flavus* from oxidative stress. VeA positively regulates the expression of oxidative stress tolerance genes such as *msnA* in *A. flavus* [38] and also in *A. nidulans* [31]. Conversely, levels of ROS as well as AFB₁ increased in Δ *msnA* *A. flavus* and *A. parasiticus* strains [53]. Furthermore, it has been demonstrated that aflatoxin biosynthesis is itself a source of intracellular ROS, and the over-expression of *msnA* could then also be the outcome of AFB₁'s inhibition [54].

Accordingly, an oxidative-stress alleviating condition, such as the addition of eugenol, could lead to an increased expression of *veA* and consequently of *msnA*. In our study, *msnA* transcripts increased by 1.9 times along with AFB₁'s inhibition in eugenol-treated cultures, following *veA*'s over-expression. This effect is possibly linked to a decrease of intracellular ROS.

3.2.2. The Putative Implication of Other Regulatory Factors and Signaling Proteins

Eugenol addition also alters the expression of other transcription-regulating factors such as (i) *nsdC* and (ii) *pacC* encoding a pH-dependent transcription factor, as well as (iii) the *grpA* and *grpK* genes involved in the G-protein signaling pathway. Except for *grpK*, these genes have been shown to be closely related to the expression of AF cluster genes and AFB₁ production [19,26,55,56]. However, to date, the exact mechanism of this interaction has to be clarified.

4. Conclusions

In this study, we bring out the transcriptomic inhibition behind eugenol's AFB₁-repressing action. This is the first time, to our knowledge, that the expression of all the 27 genes involved in AFB₁ synthesis has been studied on an inhibitor molecule. In the presence of eugenol, AFB₁ cluster genes were strongly down-modulated following decreased expression of its regulating complex AflR/AflS. We also demonstrated that this went with a modulation of seven regulatory factors. We then highlighted the involvement of *mtfA*, *veA* and *msnA* in this inhibition.

5. Materials and Methods

5.1. Chemicals and Reagents

Aflatoxin B₁ and eugenol standards were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France) and dissolved in methanol and ethanol, respectively. Stock solutions were stored at 4 °C until use. All analytical grade solvents were purchased from Thermo Fisher Scientific (Illkirch, France).

5.2. Fungal Strain and Culture Conditions

The *Aspergillus flavus* strain NRRL 62477 used in this study [57] was maintained in the dark on a Malt Extract Agar (MEA) medium (Biokar Diagnostics, Allone, France) at 27 °C.

For experiments, 10 μ L of a calibrated spore suspension (10^6 spores/mL) prepared from a seven-day culture was used to centrally inoculate the MEA medium covered with sterile cellophane layers (Hutchinson, Chalette-sur-Loing, France) as described by Leite *et al.* [58]. Firstly, five different concentrations of eugenol (0.1 to 1 mM) were tested to determine the concentration able to inhibit AFB₁ with a limited impact on fungal development, as measured by colony diameter. The concentration of 0.5 mM was selected for further experiments. Eugenol dilutions were prepared to add only 20 μ L of ethanol in the culture medium, this concentration having been identified as a no-effect dose on both fungal growth and AFB₁ production. Control cultures were performed by adding only 20 μ L of ethanol in the medium. Six replicates of each group were prepared and incubated for four days at 27 °C in the

A. flavus NRRL62477 were used to validate the amplification specificity. Negative controls in which no reverse transcriptase enzyme was added and a no template control were included to control reagents contamination. Primer sequences and their concentrations are listed in Table S2.

5.6. Analysis of the Expression of the Genes Linked to Aflatoxin B₁ Biosynthesis

Experiments were carried out using a ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The 384 well-plates were prepared by an Agilent Bravo Automated Liquid Handling Platform (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Each well contained a final volume of a 5 µL mix: 2.5 µL of Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) used as a fluorescent dye, 1.5 µL of each primer set and 1 µL of cDNA material. Three-step quantitative PCRs were performed as follows: a first one-hold stage at 95 °C for 10 min followed by 45 cycles (95 °C for 15 s and 60 °C for 30 s), and a final extending step (95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min and 95 °C for 15 s) for melt curve analysis. The results were analyzed with a Quant-Studio Real time PCR software v1.1 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Housekeeping genes were analyzed with Normfinder algorithm [61] and the more stable was used as a reference for normalization in the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ analysis method [62]. Five distinct experiments were done, each including at least three biological replicates of each condition.

5.7. Statistics

Student's *t*-test was used to analyze the differences between control and treated samples. The differences were considered to be statistically significant when the *p*-value was lower than 0.05.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Agence Nationale de la Recherche (ANR) and the Research Council of Saint-Joseph University (Lebanon), the two organizations who funded the doctoral studies of Rhoda El Khoury, as well as the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) México, funding Isaura Caceres. This work was financed by the projects Aflafree (ANR-11-ALID-0003), Aflared (joint project, 001-2012 STDF-AIRD), and ToxinFree (Campus France PHC cédre 32763). The authors would also like to thank Soraya Tadrast and Annabelle Muller for their contribution to the RNA extraction protocol.

Author Contributions: Isabelle P. Oswald, Olivier Puel, Jean-Denis Bailly, Ali Atoui, André El Khoury conceived, supervised and designed the experiments. Isaura Caceres and Rhoda El Khoury performed the experiments, contributed to experiment design. Isaura Caceres, Rhoda El Khoury, Olivier Puel and Jean-Denis Bailly wrote the paper. Ángel Medina contributed to the RNA extraction protocol and culture condition techniques; Yannick Lippi and Claire Naylies contributed to q-PCR performance and data analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
AF	Aflatoxins
AFB ₁	Aflatoxin B ₁
GPCRs	G-protein coupled receptors
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MEA	Malt Extract Agar
MFS	Major Facilitator Superfamily
mM	Millimolar
nd	Not detectable
ns	No significant changes
OE	Over-expressed
ROS	Reactive oxygen species
SEM	Standard Error of Mean
SM	Secondary metabolism
TFs	Transcription factors

References

1. Amaike, S.; Keller, N.P. *Aspergillus flavus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2011**, *49*, 107–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. I.A.R.C. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Humans.* **1993**, *56*, 245–395.
3. Bbosa, G.; Kitya, D.; Lubega, A. Review of the biological and health effects of aflatoxins on body organs and body systems. In *Aflatoxin—Recent Advances and Future Prospects*; INTECH: Hampshire, UK, 2013.
4. Meissonnier, G.M.; Pinton, P.; Laffitte, J.; Cossalter, A.-M.; Gong, Y.Y.; Wild, C.P.; Bertin, G.; Galtier, P.; Oswald, I.P. Immunotoxicity of aflatoxin B₁: Impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *231*, 142–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Groopman, J.D.; Kensler, T.W.; Wild, C.P. Protective interventions to prevent aflatoxin-induced carcinogenesis in developing countries. *Annu. Rev. Public Health* **2008**, *29*, 187–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Streit, E.; Schatzmayr, G.; Tassis, P.; Tzika, E.; Marin, D.; Taranu, I.; Tabuc, C.; Nicolau, A.; Aprodu, I.; Puel, O.; *et al.* Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed—Focus on Europe. *Toxins* **2012**, *4*, 788–809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Tabuc, C.; Marin, D.; Guerre, P.; Sesan, T.; Bailly, J.D. Molds and mycotoxin content of cereals in southeastern Romania. *J. Food Prot.* **2009**, *72*, 662–665. [[PubMed](#)]
8. Marin, S.; Ramos, A.J.; Cano-Sancho, G.; Sanchis, V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *60*, 218–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Holmes, R.A.; Boston, R.S.; Payne, G.A. Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *78*, 559–572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Ehrlich, K.C. Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* to prevent aflatoxin contamination in crops: Advantages and limitations. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Bluma, R.; Amaiden, M.R.; Daghero, J.; Etcheverry, M. Control of *Aspergillus* section *Flavi* growth and aflatoxin accumulation by plant essential oils. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *105*, 203–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Kohiyama, C.Y.; Yamamoto Ribeiro, M.M.; Mossini, S.A.G.; Bando, E.; Bomfim, N.D.S.; Nerilo, S.B.; Rocha, G.H.O.; Grespan, R.; Mikcha, J.M.G.; Machinski, M. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chem.* **2015**, *173*, 1006–1010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kumar, A.; Shukla, R.; Singh, P.; Dubey, N.K. Chemical composition, antifungal and antiaflatoxigenic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 539–543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ferreira, F.D.; Kimmelmeier, C.; Arrotéia, C.C.; da Costa, C.L.; Mallmann, C.A.; Janeiro, V.; Ferreira, F.M.D.; Mossini, S.A.G.; Silva, E.L.; Machinski, M. Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chem.* **2013**, *136*, 789–793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Cheng, S.-S.; Liu, J.-Y.; Hsui, Y.-R.; Chang, S.-T. Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresour. Technol.* **2006**, *97*, 306–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Jahanshahi, Z.; Shams-Ghahfarokhi, M.; Allameh, A.; Razzaghi-Abyaneh, M. Inhibitory effect of eugenol on aflatoxin B₁ production in *Aspergillus parasiticus* by downregulating the expression of major genes in the toxin biosynthetic pathway. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *31*, 1071–1078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Jayashree, T.; Subramanyam, C. Antiaflatoxigenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Letts. Appl. Microbiol.* **1999**, *28*, 179–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Brodhagen, M.; Keller, N.P. Signalling pathways connecting mycotoxin production and sporulation. *Mol. Plant. Pathol.* **2006**, *7*, 285–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Cary, J.W.; Harris-Coward, P.Y.; Ehrlich, K.C.; Mack, B.M.; Kale, S.P.; Larey, C.; Calvo, A.M. NsdC and NsdD affect *Aspergillus flavus* morphogenesis and aflatoxin production. *Eukaryot. Cell* **2012**, *11*, 1104–1111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Bayram, O.; Braus, G.H. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: The velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, *36*, 1–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

21. Ramamoorthy, V.; Dhingra, S.; Kincaid, A.; Shantappa, S.; Feng, X.; Calvo, A.M. The putative C₂H₂ transcription factor MtfA is a novel regulator of secondary metabolism and morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE* **2013**, *8*. [CrossRef]
22. Shaaban, M.I.; Bok, J.W.; Lauer, C.; Keller, N.P. Suppressor mutagenesis identifies a velvet complex remediator of *Aspergillus nidulans* secondary metabolism. *Eukaryot. Cell* **2010**, *9*, 1816–1824. [CrossRef] [PubMed]
23. Yu, J.; Keller, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2005**, *43*, 437–458. [CrossRef] [PubMed]
24. Montibus, M.; Pinson-Gadais, L.; Richard-Forget, F.; Barreau, C.; Ponts, N. Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. *Crit. Rev. Microbiol.* **2013**, *7828*, 1–14. [CrossRef] [PubMed]
25. Georgianna, D.R.; Payne, G.A. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: From gene to genome. *Fungal Genet. Biol.* **2009**, *46*, 113–125. [CrossRef] [PubMed]
26. Affeldt, K.; Carrig, J.; Amare, M.; Keller, N.P. Global survey of canonical *Aspergillus flavus* G protein-coupled receptors. *MBio* **2014**, *5*, 1501–1514. [CrossRef] [PubMed]
27. Tsitsigiannis, D.I.; Keller, N.P. Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends Microbiol.* **2007**, *15*, 109–118. [CrossRef] [PubMed]
28. Yin, W.; Keller, N.P. Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. *J. Microbiol.* **2011**, *49*, 329–339. [CrossRef] [PubMed]
29. Ehrlich, K.C.; Cary, J.W.; Montalbano, B.G. Characterization of the promoter for the gene encoding the aflatoxin biosynthetic pathway regulatory protein AFLR. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1444*, 412–417. [CrossRef]
30. Hong, S.-Y.; Roze, L.; Linz, J. Oxidative Stress-Related Transcription Factors in the Regulation of Secondary Metabolism. *Toxins (Basel)* **2013**, *5*, 683–702. [CrossRef] [PubMed]
31. Lind, A.L.; Wisecaver, J.H.; Smith, T.D.; Feng, X.; Calvo, A.M.; Rokas, A. Examining the evolution of the regulatory circuit controlling secondary metabolism and development in the fungal genus *Aspergillus*. *PLoS Genet.* **2015**, *11*. [CrossRef] [PubMed]
32. Kato, N.; Brooks, W.; Calvo, A. The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. *Eukaryot. Cell* **2003**, *2*, 1178–1186. [CrossRef] [PubMed]
33. Shimizu, K.; Hicks, J.K.; Huang, T.P.; Keller, N.P. Pka, Ras and RGS protein interactions regulate activity of AflR, a Zn(II)₂Cys₆ transcription factor in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **2003**, *165*, 1095–1104. [PubMed]
34. Hicks, J.K.; Yu, J.H.; Keller, N.P.; Adams, T.H. *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA Gα protein-dependent signaling pathway. *EMBO J.* **1997**, *16*, 4916–4923. [CrossRef] [PubMed]
35. Affeldt, K.J.; Brodhagen, M.; Keller, N.P. *Aspergillus* oxylipin signaling and quorum sensing pathways depend on G protein-coupled receptors. *Toxins (Basel)* **2012**, *4*, 695–717. [CrossRef] [PubMed]
36. Adams, T.H.; Hide, W.A.; Yager, L.N.; Lee, B.N. Isolation of a gene required for programmed initiation of development by *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *12*, 3827–3833. [CrossRef] [PubMed]
37. Gilbert, M.K.; Mack, B.M.; Wei, Q.; Bland, J.M.; Bhatnagar, D.; Cary, J.W. RNA sequencing of an *nsdC* mutant reveals global regulation of secondary metabolic gene clusters in *Aspergillus flavus*. *Microbiol. Res.* **2015**, *182*, 150–161. [CrossRef] [PubMed]
38. Baidya, S.; Duran, R.M.; Lohmar, J.M.; Harris-Coward, P.Y.; Cary, J.W.; Hong, S.-Y.; Roze, L.V.; Linz, J.E.; Calvo, A.M. VeA is associated with the response to oxidative stress in the aflatoxin producer *Aspergillus flavus*. *Eukaryot. Cell* **2014**, *13*, 1095–1103. [CrossRef] [PubMed]
39. Sakuda, S.; Yoshinari, T.; Furukawa, T.; Jermnak, U.; Takagi, K.; Iimura, K.; Yamamoto, T.; Suzuki, M. Search for aflatoxin and trichothecene production inhibitors and analysis of their modes of action. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2016**, *80*, 43–54. [CrossRef] [PubMed]
40. Kamatou, G.P.; Vermaak, I.; Viljoen, A.M. Eugenol—From the remote Maluku Islands to the international market place: A review of a remarkable and versatile molecule. *Molecules* **2012**, *17*, 6953–6981. [CrossRef] [PubMed]

41. Chang, P. The *Aspergillus parasiticus* protein AFLJ interacts with the aflatoxin pathway-specific regulator AFLR. *Mol. Genet. Genom.* **2003**, *268*, 711–719.
42. Kong, Q.; Chi, C.; Yu, J.; Shan, S.; Li, Q.; Li, Q.; Guan, B.; Nierman, W.C.; Bennett, J.W. The inhibitory effect of *Bacillus megaterium* on aflatoxin and cyclopiazonic acid biosynthetic pathway gene expression in *Aspergillus flavus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 5161–5172. [CrossRef] [PubMed]
43. Kim, J.H.; Campbell, B.C.; Molyneux, R.; Mahoney, N.; Chan, K.L.; Yu, J.; Wilkinson, J.; Cary, J.; Bhatnagar, D.; Cleveland, T.E. Gene targets for fungal and mycotoxin control. *Mycotoxin Res.* **2006**, *22*, 3–8. [CrossRef] [PubMed]
44. Yoshinari, T.; Akiyama, T.; Nakamura, K.; Kondo, T.; Takahashi, Y.; Muraoka, Y.; Nonomura, Y.; Nagasawa, H.; Sakuda, S. Diocatin A is a strong inhibitor of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Microbiology* **2007**, *153*, 2774–2780. [CrossRef] [PubMed]
45. Ehrlich, K.C. Predicted roles of the uncharacterized clustered genes in aflatoxin biosynthesis. *Toxins (Basel)* **2009**, *1*, 37–58. [CrossRef] [PubMed]
46. Chang, P.-K.; Yu, J.; Yu, J.-H. *afIT*, a MFS transporter-encoding gene located in the aflatoxin gene cluster, does not have a significant role in aflatoxin secretion. *Fungal Genet. Biol.* **2004**, *41*, 911–920. [CrossRef] [PubMed]
47. Zhuang, Z.; Lohmar, J.M.; Satterlee, T.; Cary, J.W.; Calvo, A.M. The master transcription factor *mtfA* governs aflatoxin production, morphological development and pathogenicity in the fungus *Aspergillus flavus*. *Toxins (Basel)* **2016**, *8*, 1–16. [CrossRef] [PubMed]
48. Calvo, A.M. The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genet. Biol.* **2008**, *45*, 1053–1061. [CrossRef] [PubMed]
49. Calvo, A.M.; Bok, J. *veA* is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 4733–4739. [CrossRef] [PubMed]
50. Sprote, P.; Brakhage, A.A. The light-dependent regulator velvet A of *Aspergillus nidulans* acts as a repressor of the penicillin biosynthesis. *Arch. Microbiol.* **2007**, *188*, 69–79. [CrossRef] [PubMed]
51. Dhingra, S.; Lind, A.L.; Lin, H.-C.; Tang, Y.; Rokas, A.; Calvo, A.M. The fumagillin gene cluster, an example of hundreds of genes under *veA* control in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE* **2013**, *8*. [CrossRef] [PubMed]
52. Reverberi, M.; Zjalic, S.; Ricelli, A.; Punelli, F.; Camera, E.; Fabbri, C.; Picardo, M.; Fanelli, C.; Fabbri, A.A. Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: A role for the *ApyapA* gene. *Eukaryot. Cell* **2008**, *7*, 988–1000. [CrossRef] [PubMed]
53. Chang, P.; Scharfenstein, L.; Luo, M. Loss of *msuA*, a putative stress regulatory gene, in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* increased production of conidia, aflatoxins and kojic acid. *Toxins (Basel)* **2011**, *3*, 82–104. [CrossRef] [PubMed]
54. Roze, L.; Laivenieks, M.; Hong, S.-Y.; Wee, J.; Wong, S.-S.; Vanos, B.; Awad, D.; Ehrlich, K.; Linz, J. Aflatoxin biosynthesis is a novel source of reactive oxygen species—A potential redox signal to initiate resistance to oxidative stress? *Toxins (Basel)* **2015**, *7*, 1411–1430. [CrossRef] [PubMed]
55. Keller, N.P.; Nesbitt, C.; Sarr, B.; Phillips, T.D.; Burow, G.B. pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathology* **1997**, *87*, 643–648. [CrossRef] [PubMed]
56. Ehrlich, K.C.; Montalbano, B.G.; Cary, J.W.; Cotty, P.J. Promoter elements in the aflatoxin pathway polyketide synthase gene. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1576*, 171–175. [CrossRef]
57. El Mahgubi, A.; Puel, O.; Bailly, S.; Tadriss, S.; Querin, A.; Ouadia, A.; Oswald, I.P.; Bailly, J.D. Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in spices marketed in Morocco. *Food Control* **2013**, *32*, 143–148. [CrossRef]
58. Leite, G.M.; Magan, N.; Medina, Á. Comparison of different bead-beating RNA extraction strategies: An optimized method for filamentous fungi. *J. Microbiol. Methods* **2012**, *88*, 413–418. [CrossRef] [PubMed]
59. Fu, Z.; Huang, X.; Min, S. Rapid determination of aflatoxins in corn and peanuts. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1209*, 271–274. [CrossRef] [PubMed]
60. Zeng, Y.; Yang, T. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Mol. Biol. Rep.* **2002**, *20*. [CrossRef]

61. Andersen, C.L.; Jensen, J.L.; Ørntoft, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 5245–5250. [CrossRef] [PubMed]
62. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [CrossRef] [PubMed]



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Materials: Deciphering the Anti-Aflatoxinogenic Properties of Eugenol Using a Large-Scale q-PCR Approach

Isaura Caceres, Rhoda El Khoury, Ángel Medina, Yannick Lippi, Claire Naylies, Ali Atoui, André El Khoury, Isabelle P. Oswald, Jean-Denis Bailly and Olivier Puel

Table S1. Gene expression values of regulatory factors that were not impacted upon Eugenol addition. Values are expressed in fold change and compared to a control fixed at 1.

Gene Name	Values	p-Value
<i>abaA</i>	1.13	0.8179
<i>ap-1</i>	1.12	0.4589
<i>areA</i>	1.29	0.4578
<i>atfA</i>	2.09	0.0537
<i>brlA</i>	0.77	0.1953
<i>cat2</i>	1.13	0.8072
<i>catA</i>	1.84	0.3623
<i>creA</i>	1.32	0.648
<i>fadA</i>	0.95	0.891
<i>fcr3</i>	0.73	0.0836
<i>flbA</i>	0.55	0.2958
<i>fluG</i>	1.11	0.5914
<i>gprG</i>	1.52	0.1591
<i>gprH</i>	0.84	0.3971
<i>gprP</i>	1.29	0.2462
<i>laeA</i>	1.05	0.7673
<i>meaB</i>	1.43	0.1367
<i>mnSOD</i>	0.84	0.3045
<i>ppoA</i>	1.26	0.2914
<i>ppoB</i>	0.77	0.4413
<i>ppoC</i>	0.89	0.6097
<i>rasA</i>	0.88	0.4225
<i>SOD1</i>	0.95	0.8985
<i>srrA</i>	1.69	0.2001
<i>velB</i>	1.43	0.3543
<i>vosA</i>	1.49	0.1905

Table S2. Primer sequences of the 62 designed genes.

Access Number	Gene	nM	Primers Sequences 5' to 3'	
AFLA_139380	<i>aflA</i>	300/900	F: CCAGTCGGTGGTGTGCAAAA	R: CGCAGCACCCAGAGCTT
AFLA_139370	<i>aflB</i>	300/300	F: GTCTGCGCAGGCCATTTTC	R: AGTCTTGGCCTTCAACAGTCTC
AFLA_139410	<i>aflC</i>	300/300	F: CTGACCCCGGCATTTTCG	R: TGCCAGATTCCTCATATCCCCG
AFLA_139390	<i>aflD</i>	300/900	F: AGGCATCTGTGCTCGGATTG	R: TGCCCCGATGTAGTCTCCTTAGT
AFLA_139310	<i>aflE</i>	900/300	F: CTGCAACACTCGGCTAGAAACA	R: GAAGGGTTCGATCGGCTGT
AFLA_139260	<i>aflG</i>	900/900	F: CATGCAGAGTAACCGCATCGT	R: TTGTAGACCGACGGATGTCCC
AFLA_139330	<i>aflH</i>	900/900	F: CCAGCTCCACGGTCGG	R: CTTAAGGTCAAAGATTCCTCCGG
AFLA_139230	<i>aflI</i>	300/300	F: GATCGGCTCGTTTGAGGGA	R: GCAAAAATGATATTCAGCTGGTTTGAC
AFLA_139320	<i>aflJ</i>	300/900	F: GCTCCGTGGCACCAGTT	R: TCGTCACGCTCTCATCGG
AFLA_139190	<i>aflK</i>	300/300	F: ACAGCGCGAAAATGTTTTATATGC	R: GCGCCTTTTCGAGCCTCTG
AFLA_139250	<i>aflL</i>	300/300	F: CCGATTCGTACCCGAAGAGAC	R: TCGGCAAAGTAGGTACCGAGAT
AFLA_139300	<i>aflM</i>	900/900	F: TCCTGGAGCCATTAAGACTGATATGT	R: GCCAAGCGGGCCTC
AFLA_139280	<i>aflN</i>	300/300	F: CCAGGCTCGCCAGGAAGT	R: AGCTTGAACCTCTGGCATAGGAAGG
AFLA_139220	<i>aflO</i>	300/900	F: CCCCAAGAGTATACCTCGAGTGC	R: AAGGTCCCAGATGTGCAATAGTT
AFLA_139210	<i>aflP</i>	900/300	F: TATTCTACATGACTATCCCAGATGCTG	R: GCGCGACTTGCTTGGGT
AFLA_139200	<i>aflQ</i>	900/900	F: GGGAGGATCGGACACGACA	R: CATGGCCACGAAAAGCTAGAC
AFLA_139360	<i>aflR</i>	900/900	F: GCGGCACAGCTTGTCTGA	R: CCGGTATCCCTGCTGCATC
AFLA_139340	<i>aflS</i>	900/900	F: AACGGTCGTGCATGTGGG	R: CGGCCTTAGCTTCTGTCTGC
AFLA_139420	<i>aflT</i>	300/300	F: GTAGCATGCGCCTCCGTCT	R: GCGAATGGCTTGAACCAG
AFLA_139180	<i>aflV</i>	300/900	F: CCTGGTGGTTCCTCGTGT	R: TGAAATATGCGGTTTGAAGAATCTTG
AFLA_139170	<i>aflW</i>	300/900	F: CGATGTCTTTGTGCGGACG	R: GTGTTGCCCCGCTAGCACTC
AFLA_139160	<i>aflX</i>	900/900	F: GATCCACGCTACTGCCGT	R: GATCTCAGGATGCAATCGGTTT
AFLA_139150	<i>aflY</i>	300/300	F: GGTGTCCTACCGTCTTAAATGAGT	R: CAATGGGTGGAGAAAGCCAGA
AFLA_139240	<i>hypB</i>	900/300	F: TCCTGCACITCAAGCTACCGC	R: GACGCTCATATGGCTCCG
AFLA_139400	<i>hypC</i>	900/900	F: GGTCCTTTTGACGGGAGCC	R: TCTCGATAAGAATGGGAATGGTGA
AFLA_139270	<i>hypD</i>	300/900	F: TTGCGTTTGCCGACGG	R: GCGCATAACTCCAATGTCCC
AFLA_139290	<i>hypE</i>	900/900	F: AAGTTCCCGACTTTCCCGC	R: CAAAGTTGATAATAGCAAATCCGTCATA
AFLA_029620	<i>abaA</i>	900/900	F: TACAAAATACTGGCAAAAGGAGGTC	R: CCCGTACAAGCCTCTCCCA
AFLA_129340	<i>ap-1</i>	900/300	F: CTTGCACCAAGATTTGGGACC	R: TCGTACGCAATTCGGAGCA
AFLA_049870	<i>areA</i>	300/900	F: CAGCCAATCCGGCGAAC	R: CCCATTCTGACTAGCCCCTT
AFLA_031340	<i>atfA</i>	900/900	F: GCAGTTACAGGCACCTTAACACATC	R: CGGCGCCTGGGAGTCTT
AFLA_082850	<i>brlA</i>	300/300	F: GCGTGCCTTCTCCCGC	R: GGAGTCCATCCGGTGTGAGTT
AFLA_068620	β -tub	300/900	F: AACGTCTACTTCAACGAGGCCA	R: GTACCAGGCTCAAGATCAACGAG

Table S2. Cont.

AFLA_056170	<i>catA</i>	300/900	F: ATTAAGTTCCTGGATTTTGCCA	R: GGTACCTCGTTGTGCGGCT
AFLA_134680	<i>creA</i>	300/900	F: CAGCCGGAAGGCCCC	R: CATATCTTGCACCGCGACCT
AFLA_018340	<i>fadA</i>	900/900	F: TACATCTCAACCGTTCGTG	R: GGTTCTCTGGATGATGATGCATT
AFLA_133560	<i>fcr3</i>	300/900	F: GGCACAGAACAGAGCAGCTCAA	R: GCACATGTCCCTCCTTCGTT
AFLA_134030	<i>flbA</i>	300/900	F: CTGGCTGCAGCATATGGTCTT	R: CATTGATTCGTCATCCCCTACAG
AFLA_101920	<i>fluG</i>	300/300	F: CGCCGGTTACCTAGGCGT	R: TTGGCGGCATCGTGGA
AFLA_025100	<i>gpdA</i>	900/900	F: CGTGTGTTGACCTCATTGCCT	R: GGTGACCTGATAATCCGGGAAC
AFLA_060740	<i>gprA</i>	900/900	F: CTTCTGCAGTATCTTCATTATCAAGCTC	R: AATCGAAAGCAGCGCTGG
AFLA_067770	<i>gprG</i>	300/900	F: CCGCATTAGCGGAAACTT	R: GGCGTTAGGGTTGTGAGGAG
AFLA_006920	<i>gprH</i>	300/900	F: TTGATTGTACCTGGGTTCTTC	R: CATAGTTCAGAGCAAAGTTGTGGGA
AFLA_009790	<i>gprK</i>	300/900	F: CTTGCCATGCAGGTAGTCAAC	R: TCCAAATGGACAGGCAAATCC
AFLA_088190	<i>gprP</i>	300/300	F: CGATGCAGTCTTTCTAAGGGTGG	R: GCCATCGATTGTACCATGTGTGA
AFLA_033290	<i>laeA</i>	900/900	F: TGCCAACAAATACCCAGACG	R: TCGCAATTCTTTGGGTGGTT
AFLA_031790	<i>meaB</i>	900/900	F: CCAAAGCACTATGATCAGCTTGAA	R: CCCACGGACGACTCATGC
AFLA_033420	<i>mnSOD</i>	300/300	F: GGTGGCTAATGGACCGGG	R: CATACGAGGCCTTGTATTGAAGTACTG
AFLA_110650	<i>msnA</i>	900/900	F: GACGTCCATGCCGAGCTTT	R: AATTGGCGTTGATGAAGACAGG
AFLA_091490	<i>mtfA</i>	300/900	F: GCATCGACATATGCTGCAAAG	R: GGCGCAAAGGTGGAGTAGG
AFLA_131330	<i>nsdC</i>	300/900	F: TCCAGGACCACATGACTCCAA	R: GCTGTGCCCTTAAAGCAGCTACT
AFLA_030580	<i>pacC</i>	900/300	F: CAAGGATGTTCTGAGAAGTGCCC	R: CGTTCGACAGCGTGCTCATA
AFLA_026790	<i>ppoA</i>	300/900	F: ATCAAGAGGCTGGCGAAGGT	R: GGGCCCTTCCATGAAGTA
AFLA_120760	<i>ppoB</i>	300/900	F: AGTCTCTATGCGTTCCTATGACTTG	R: CGTCCCTTCCCGGAAT
AFLA_030430	<i>ppoC</i>	300/300	F: GTTACAATCAGGCTCAAATGTTT	R: CAGGCAGTAGCGCATCAACTT
AFLA_132380	<i>rasA</i>	300/300	F: GCGAGCCGTCACAGTAGAAGAG	R: CGGATGTTTCGATAAATTTGCAG
AFLA_099000	<i>sod1</i>	900/300	F: CGAGAGCGTACTTGGCCGT	R: TCTTCTGGACTCCGGGTGTT
AFLA_034540	<i>srrA</i>	300/900	F: TGTCGTGAGATTGGCGGAA	R: GCCTCGAGTCCGTCGAAAG
AFLA_066460	<i>veA</i>	300/300	F: CGTCAGCCGGATCACTCG	R: GACGGTCCGCAGAGGACTT
AFLA_081490	<i>velB</i>	300/300	F: GGCTTCGGCGACAAGGAT	R: TCTGCGTTCACAAGTCTACCA
AFLA_026900	<i>vosA</i>	300/900	F: GGGTGTTCAGATTATGCGATG	R: CCCGTTGAATCCCCCGTAG

C. Conclusion


En conclusion, des molécules et des extraits naturels très divers ont un effet anti-aflatoxinogène. La connaissance du mécanisme d'action à l'origine de cette inhibition devrait permettre une meilleure exploitation de leurs effets ainsi que le développement de méthodes de lutte alternatives plus ciblées mais aussi la mise en place de screening de nouveaux extraits actifs sur la base de propriétés mieux identifiées.

A l'heure actuelle, les effets de ces composés sur la physiologie fongique ont surtout été décrits au niveau enzymatique. Les voies moléculaires qui pourraient initier sont, elles, très peu documentées. Afin de mieux caractériser l'effet des extraits anti-aflatoxinogènes, il était donc nécessaire d'élaborer un outil qui permet l'identification des voies métaboliques pouvant être influencées par ces extraits, en particulier au niveau moléculaire. Nous nous sommes servis d'une molécule dont l'effet anti-aflatoxinogène avait préalablement été identifié, l'eugénol, comme modèle pour valider la conception de cet outil.

Nous avons ainsi montré que l'eugénol agit au niveau transcriptomique. L'inhibition de la production d'AFB1 induite par ce composé est due à la répression des gènes du cluster de la toxine suite à une modulation négative de son complexe régulateur AflR/AflS. L'activité de ce complexe a été également affectée par plusieurs facteurs de transcription globaux: VeA et MtfA ainsi que MsnA, un facteur impliqué dans la réponse au stress oxydant cellulaire. Ces résultats ont permis de mettre en évidence une voie d'interaction entre le métabolisme fongique global et la synthèse des aflatoxines.

Par la suite, nos travaux se sont attachés à identifier des extraits naturels de plantes médicinales capables d'inhiber la production d'aflatoxines. Cet outil a alors été utilisé pour caractériser les mécanismes d'inhibition des extraits actifs identifiés.

**Chapitre 2 – Test d’efficacité d’extraits de plantes :
Comparaison de l’effet anti-aflatoxine d’huiles
essentielles et d’extraits aqueux**



A. Introduction

Les plantes médicinales produisent une multitude de composés bioactifs (terpénoïdes, composés phénoliques, alcaloïdes, etc.), issus de leur métabolisme secondaire et pouvant servir de moyens de défense contre différentes agressions environnementales. Ces métabolites font désormais l'objet d'attention car ils pourraient être utilisés pour contrôler le développement fongique et la production de mycotoxines dans les produits agricoles et représenter ainsi une stratégie alternative intéressante de lutte contre ces contaminants des aliments.

La plupart des extraits actifs contre la synthèse de mycotoxines caractérisés à ce jour sont plutôt de nature lipophile, telles les huiles essentielles et leurs constituants (Kedia et al., 2015; Prakash et al., 2015). Comme évoqué dans l'introduction de ce travail, il n'existe que peu de données sur l'efficacité éventuelle d'extraits de nature aqueuse. Ces extraits peuvent aussi être riches en composés phénoliques et posséder des propriétés antioxydantes qui pourraient donc également être intéressantes dans le contrôle de la contamination fongique et/ou mycotoxique (Omidpanah et al., 2015; Skotti et al., 2014).

L'objectif de cette étude a donc été de comparer l'efficacité d'huiles essentielles et d'extraits aqueux issus des mêmes plantes. En effet, la comparaison de l'efficacité de ces deux types d'extraits pourrait amener de nouvelles perspectives dans l'application de ces moyens de lutte naturelle mais aussi dans l'identification des composés actifs sur la synthèse des mycotoxines. Pour cela, nous avons donc évalué l'effet fongistatique et/ou anti-aflatoxinogène des extraits aqueux et des huiles essentielles de neuf plantes.

Il ressort de cette étude que les extraits aqueux sont souvent aussi, voire plus efficaces que les huiles essentielles correspondantes pour limiter la production de toxine, sans modification de la croissance fongique.

B. Article en préparation:**Screening the anti-aflatoxinogenic activity of aqueous plant extracts in comparison to their essential oils**

Rhoda El Khoury^{a,b}, Ali Atoui^c, Olivier Puel^a, Isabelle P. Oswald^a, Jean-Denis Bailly^{a*},
André El Khoury^b

^a Toxalim, Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP Purpan, UPS, Toulouse, France.

^b Laboratoire de Mycologie et sécurité des aliments (LMSA), Département de Biochimie, Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph, P.O Box 11- 514, Beirut 1107 2050, Lebanon

^c Laboratory of Microbiology, Department of Natural Sciences and Earth, Faculty of Sciences I, Lebanese University, Hadath Campus, P.O. Box 11-8281, Beirut, Lebanon.

*Correspondance:

Jean-Denis Bailly; e-mail: jd.bailly@envt.fr

Tel: + (33) 5 61 19 32 29

Abstract

Many strategies are continuously developed to control the risk of aflatoxin B1 (AFB1) contamination in foods and feeds. The use of plants extracts that inhibit AFB1 production or *Aspergillus flavus* development could represent an alternative strategy to pesticides. Essential oils extracted from plants are being used as biopesticides or fumigants to counteract aflatoxin formation. However, their use carries multiple limitations i) toxicity by ingestion at high doses, ii) phytotoxicity, iii) high content in volatile compounds that require multiple applications and iv) modification of organoleptic qualities of foods due to highly aromatic components. Nine essential oils (EOs) and aqueous extracts (AEs) of the same plants were screened for their anti-aflatoxinogenic properties. Aqueous extracts presented the same ability as EOs to inhibit the production of AFB1 without altering fungal growth. Six AEs were able to completely inhibit aflatoxin production in culture medium: chamomile, cumin, laurel leaves, rosemary, sage and thyme. These AEs can be further exploited as an alternative to the use of EOs in crops for AFB1 prevention.

Key Words: Essential oils, aqueous extracts, aflatoxin B1, inhibition

1. Introduction

Aspergillus flavus is a fungal species occurring in crops during field growth as well as during storage when conditions become favorable for its development. The main threat of this fungus is its ability to produce aflatoxin B1 (AFB1), the most potent naturally occurring carcinogen, in commonly-consumed food commodities such as cereals, nuts and dried fruit (Amaiike and Keller, 2011; Klich, 2007). AFB1 is currently the most strictly regulated mycotoxin internationally with the JECFA committee recommending that its contamination levels in foods apply to the ALARA principle (As Low As Reasonably Achievable) (FAO/WHO, 1999).

Along with implementing good agricultural practices, several approaches were used and being developed to avoid fungal development and further AFB1 crop contamination. Pesticides and fungicides are the most common solution to limit fungal contamination. However, their own toxicity as well as the appearance of resistance in targeted fungal species represent two strong drawbacks for their use (Brent and Hollomon, 2007). Therefore, in an attempt of considering more sustainable strategies, assays of biological control through soil or lactic acid bacteria and atoxinogenic fungal species have been tested for their efficiency to limit the development of aflatoxinogenic species (Ahlberg et al., 2015; Cotty and Bhatnagar, 1994; Jane et al., 2014; Shams-ghahfarokhi et al., 2013). Though, the use of these strains also carries some limits and their long-term effect is still under investigation (Ehrlich, 2014). Alternative eco-friendly strategies can also consist on the use of plant extracts, as a replacement to chemicals. Plants produce a number of bioactive compounds (terpenoids, alkaloids, phenolic compounds, etc.) as part of their defense mechanism in response to diverse environmental aggressions (Isman and Machial, 2006). Essential oils (EOs) are mainly extracted from plants by steam- or hydro-distillation and are constituted for the most part of mono- and sesqui-terpenes (Chizzola, 2013). A large number of EOs is now characterized as having many bioactive properties among which fungicidal and/or an anti-aflatoxinogenic effects were observed (Bluma et al., 2008; Ferreira et al., 2013; Kedia et al., 2014; Kumar et al., 2008; Prakash et al., 2015; Rasooli et al., 2008; Tian et al., 2012). Few of them, such as rosemary, jojoba and thyme EOs, are

already marketed as fungicides for organic farmers (Dayan et al., 2009). Nonetheless, use of EOs also has some limitations: i) at high concentrations, they can be toxic to humans after ingestion (Hartnoll et al., 1993; Prashar et al., 2004; Tisserand and Young, 1996; Tisserand, 1997), ii) they can also be phytotoxic (Isman, 2000) iii) they are highly volatile and can be subjected to oxidation by light or heat (Kedia et al., 2015) and iv) their aromatic characteristic can alter organoleptic properties of treated commodities (Kumar et al., 2010). On the other side, although medicinal plants are commonly used in a simple aqueous infusion, aqueous plant extracts have been rarely exploited for their fungicidal or anti-aflatoxinogenic effect (Gorran et al., 2013; Omidpanah et al., 2015). Thus, the focus of this study was to compare the fungicidal and anti-aflatoxinogenic properties of EOs and aqueous extracts (AEs) of nine plants/spices.

2. Materials and methods

2.1. Solvents and standards

HPLC grade methanol, acetonitrile and water as well as lyophilized aflatoxin B1 standard were purchased from Sigma Aldrich (Munich, Germany). Stock solutions of AFB1 were prepared in methanol and stored at 4°C in the darkness. Calibration curves were prepared before use by diluting stock solutions with methanol prior to HPLC analysis.

2.2. Essential oils and preparation of aqueous plant extracts

Essential oils and dried plants of anise, chamomile, cumin, fennel, hyssop, laurel leaves, mint, rosemary, sage and thyme were commercially purchased from Tyr, Lebanon. For aqueous extract preparation, plants were grinded with an electrical grinder, except for cumin which was purchased in powder form. Ten grams of ground matter were added to 80 ml of distilled water and placed on a horizontal shaking table at 220 rpm for 24 hours. Extracts were then filtered through cotton gauze before being centrifuged for 10 min at 3500 rpm. Filtrates were centrifuged once again, at 4700 rpm for 30 min and autoclaved at 121°C for 20 min. Final sterile extracts were stored at +4°C until use.

2.3. Fungal strain and growth condition

Aspergillus flavus strain (NRRL 62744) was used to evaluate growth and aflatoxin inhibition by AEs and Eos. Strain was cultivated on Malt Extract Agar (MEA) medium (30 g malt extract and 15 g agar-agar per liter) (Biokar Diagnostics, Allone, France) that was supplemented at 0.5% v/v with an essential oil or by an aqueous extract at 10 mg/ml. For experiments, 10 µl of a calibrated spore suspension (10^6 spores/ml) prepared from a 7-day culture was used to centrally inoculate the MEA medium. Cultures were held in the darkness at 27°C. Following an incubation period of 8 days, two perpendicular colony diameters were measured for growth inhibition determination and cultures were extracted for AFB1 quantification. Each condition was prepared in triplicate.

2.4. AFB1 extraction and HPLC quantification

Media of 8-day cultures were cored at the central, mid-radius and peripheral part of the thallus. Cores were weighed and extracted with 1 ml of methanol before being centrifuged for 1 min at 13000 rpm. Supernatants were recovered and an additional 1 ml was added to media followed by another centrifugation step. Extracts were then pooled and filtered through a 0.45 µm filters (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Gottingen, Germany) before analysis. HPLC analysis was performed using a Waters e2695 Separation module (Milford, MA, USA) equipped with a 25 x 4.6 cm, 5 µm, Discovery® C18 LC column (Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA). Aflatoxins were separated using a gradient program at a flow of 1 ml/min where eluent A: acidified water (2% acetic acid) and eluent B: acetonitrile. Elution conditions were as follows: 5 min A:B (80:20) followed by an increase in eluent B to 50% at 20 min then to 90% at 25 min and back at 20% at 32 min. Aflatoxins were detected at a retention time of 16.5 min using a Waters 2475 Multi wavelength fluorescent detector at wavelengths of 365/430 nm (excitation/emission). Sample concentrations were calculated based on a standard calibration curve that included nine concentrations ranging between 0.005 and 2 µg/ml.

3. Results and Discussion

3.1. No significant inhibitory effect on *A. flavus* growth related to AFB1 inhibition

In this study, AEs showed a great ability to inhibit aflatoxin production without impairing fungal growth at the tested concentrations (**Figure 1**). All of the extracts, EOs and aqueous extracts, except for the EO of thyme showed no growth inhibition of *A. flavus*. This is particularly interesting since by blocking the development of the very competitive *A. flavus*, other potential microbial contaminants might occur. Therefore a complete inhibition of *A. flavus* growth carries high risks since these contaminants might be unknown and thus hard to control or their toxicity might have not been evaluated yet. Nevertheless, the appearance of aerial hyphae was observed with almost all tested AEs, except for sage. While in EOs, aerial hyphae were the least present in thyme and mint. Therefore the presence of hyphae cannot be related to aflatoxin inhibition.

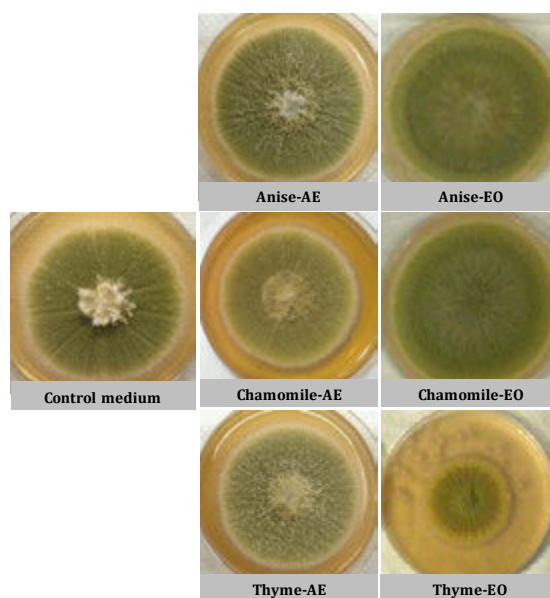


Figure 1. Cultures of *A. flavus* 62744 on MEA medium (27°C - 8 days) supplemented with AEs and EOs of anise, chamomile and thyme.

3.2. Essential oils and aqueous extracts present similar anti-aflatoxinogenic activities

All of the plants having EOs with AFB1-inhibition activities also presented this inhibitory activity in their AEs (**Table 1**). Fennel did not present any inhibitory activity in either of its extracts. In the case of chamomile, cumin, laurel leaves, rosemary, sage, and thyme, the anti-aflatoxinogenic activity was quasi-total as AFB1 levels were not detected in cultures supplemented with these extracts. EOs of sage, chamomile and cumin also presented significant AFB1 inhibitions that were respectively at 82.8, 83.7 and 87.1%. EO of rosemary used in this study did not present any drastic inhibitory activity (16.8%) and in the case of the EO of thyme, there was rather an increase in AFB1 production. Both of these EOs are known for their fungistatic effects and are commercialized as biopesticides (Dayan et al., 2009; Deabes et al., 2011; Soylyu et al., 2010). However, it should be considered that EOs' composition is naturally hardly reproducible since a plant's composition varies when cultivated on different soils or under different environmental conditions (Kedia et al., 2015). This difference can also be due to varying extraction yields following hydro- or steam-distillation. Such a different composition in EOs can affect their levels of bioactive compounds and consequently their overall antifungal or anti-aflatoxinogenic activity. Such is the case of the EO of basil (*Ocimum basilicum*) where the study of Kumar et al. (2010) showed a 61.3% content in eugenol with a minimal fungicidal concentration (MFC) of 300 ppm towards *A. flavus* where another study of Abou El-Soud et al. (2015), using a basil EO with a 6.6% of eugenol demonstrated this MFC with a higher concentration of 1000 ppm.

Furthermore, the EO of anise presented a much higher AFB1 production inhibition than that of its aqueous extract. Nevertheless, the effect of the latter remains significant (62.5%) and higher concentrations should be considered to achieve a total inhibition.

Table 1. Comparison of growth and production inhibitions of essential oils and aqueous extracts

Plant	Growth inhibitions		AFB1 production inhibitions	
	EO	AE	EO	AE
Anise	0%	-3.6%	100%	62.5%
Chamomile	-17.2%	-5%	83.7%	100%
Cumin	-1.4%	-0.2%	87.1%	100%
Fennel	3%	-0.08%	-3.4%	-31.8%
Laurel leaves	0%	3.9%	85.9%	100%
Mint	-11.0%	-3%	90%	87.4%
Rosemary	-6.9%	5%	16.8%	100%
Sage	-10.3%	4.8%	82.8%	100%
Thyme	40.7%	-0.5%	-47.7%	100%

All the tested aqueous extracts, except fennel, showed a good potential to inhibit AFB1 production *in vitro*. Very few studies have discussed anti-aflatoxinogenic or antifungal properties of AEs (Gorran et al., 2013; Omidpanah et al., 2015). Being of an aqueous nature, these extracts are less prone to causing toxic effects and could then represent a good alternative to essential oils. Furthermore, AEs can be rich in phenolic compounds and carry little to no volatile compounds, not sufficiently to alter any organoleptic property of treated commodities (Skotti et al., 2014).

Conclusion

Essential oils are known to be anti-fungal agents and some of them are also responsible for blocking mycotoxin synthesis without alteration of fungal growth. However their use as biopesticides carries numerous limitations. We demonstrated that plants with anti-aflatoxinogenic EOs, can also present such inhibitory effect of AFB1 production with their aqueous extracts. This activity deserves to be further exploited as an alternative to essential oils. Furthermore, aqueous extracts of medicinal plants can potentially be

considered less toxic than essential oils since their common consumption usually occurs in decoction. Most importantly, the use of AEs as biopesticides would not alter organoleptic properties of treated commodities since they carry little or no compounds with highly volatile and aromatic properties.

References

- Ahlberg, S. H., Joutsjoki, V., & Korhonen, H. J. (2015). Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. International Journal of Food Microbiology, 207, 87–102.
- Amaike, S., & Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. Annual Review of Phytopathology, 49(April), 107–33.
- Bluma, R., Amaiden, M. R., Daghero, J., & Etcheverry, M. (2008). Control of *Aspergillus* section *Flavi* growth and aflatoxin accumulation by plant essential oils. Journal of Applied Microbiology, 105(1), 203–14.
- Brent, K. J., & Hollomon, D. W. (2007). Fungicide resistance: the assessment of the risk. *Fungicide Resistance Action Committee*, FRAC Monograph 53.
- Chizzola, R. (2013). Chapter 96 - Regular Monoterpenes and Sesquiterpenes (Essential Oils). In Natural Products, p. 2973.
- Cotty, P. J., & Bhatnagar, D. (1994). Variability among atoxigenic *Aspergillus flavus* strains in ability to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxin biosynthetic pathway enzymes. Applied and Environmental Microbiology, 60(7), 2248–2251.
- Dayan, F. E., Cantrell, C. L., & Duke, S. O. (2009). Natural products in crop protection. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 17(12), 4022–4034.
- 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.
- Ehrlich, K. C. (2014). Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* to prevent aflatoxin contamination in crops: advantages and limitations. Frontiers in Microbiology, 5, 50.
- EL Mahgubi, A., Bailly, S., Tadrist, S., Querin, A., Ouadia, A., Oswald, I. P., & Bailly, J.D. (2013). Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in spices marketed in Morocco. Food Control, 32(1), 143–148.
- FAO/WHO. (1999). 49th JECFA Meeting. Evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva.
- Ferreira, F. D., Kimmelmeier, C., Arrotéia, C. C., da Costa, C. L., Mallmann, C. A., Janeiro, V., Machinski, M. (2013). Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on

- aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. Food Chemistry, 136 (2), 789–93.
- Gorran, A., Farzaneh, M., Shivazad, M., Rezaeian, M., & Ghassempour, A. (2013). Aflatoxin B1-reduction of *Aspergillus flavus* by three medicinal plants (*Lamiaceae*). Food Control, 31 (1), 218–223.
- Hartnoll, G., Moore, D., & Douek, D. (1993). Near fatal ingestion of oil of cloves. Archives of Disease in Childhood, 69 (4), 392–393.
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection, 19, 603–608.
- Isman, M. B., & Machial, C. M. (2006). Chapter 2 Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. Advances in Phytomedicine, 3 (C), 29–44.
- Jane, C., Kiprop, E. K., & Mwamburi, L. A. (2014). Biocontrol of Aflatoxins in Corn using Atoxigenic *Aspergillus flavus*: Review. International Journal of Science and Research, 3(12), 1954–1958.
- Kedia, A., Jha, D. K., & Dubey, N. K. (2015). Plant essential oils as natural fungicides against stored product fungi. In The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs, pp. 208–214.
- Kedia, A., Prakash, B., Mishra, P. K., Chanotiya, C. S., & Dubey, N. K. (2014). Antifungal, antiaflatoxigenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. International Biodeterioration & Biodegradation, 89, 29–36.
- Klich, M. A. (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. Molecular Plant Pathology, 8(6), 713–22.
- Kumar, A., Shukla, R., Singh, P., & Dubey, N. K. (2010). Chemical composition, antifungal and antiaflatoxigenic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. Food and Chemical Toxicology, 48(2), 539–543.
- Kumar, A., Shukla, R., Singh, P., Prasad, C. S., & Dubey, N. K. (2008). Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 9(4), 575–580.
- Omidpanah, S., Sadeghi, H., Mohamadian, M., & Manayi, A. (2015). Evaluation of antifungal activity of aqueous extracts of some medicinal plants against *Aspergillus flavus*, pistachio aflatoxin producing fungus *in vitro*. Drug Development and Therapeutics, 6(2), 66–69.
- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2015). Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges. Food Control.
- Prashar, A., Locke, I. C., & Evans, C. S. (2004). Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. Cell Proliferation, 37(3), 221–229.
- Rasooli, I., Fakoor, M. H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A., & Rezaei, M. B. (2008). Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L.


- essential oils. International Journal of Food Microbiology, 122(1-2), 135–9.
- Shams-Ghahfarokhi, M., Kalantari, S., & Razzaghi-abyaneh, M. (2013). Terrestrial Bacteria from Agricultural Soils: Versatile Weapons against Aflatoxigenic Fungi. In *Aflatoxins-Recent Advances and Future Prospects*, chapter 2, pages 23-39.
- Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., & Tarantilis, P. A. (2014). Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. Industrial Crops and Products, 53, 46–54.
- Soylu, E. M., Kurt, S., & Soyly, S. (2010). *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. International Journal of Food Microbiology, 143(3), 183–9.
- Tian, J., Huang, B., Luo, X., Zeng, H., Ban, X., He, J., & Wang, Y. (2012). The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. Food Chemistry, 130(3), 520–527.
- Tisserand, R. (1997). Essential Oil Safety III. Carcinogenesis, Phototoxicity. The International Journal of Aromatherapy, 8(1), 23–27.
- Tisserand, R., & Young, R. (1996). Essential Oil Safety II. Metabolism, Neurotoxicity, Reproductive Toxicity. The International Journal of Aromatherapy, 7(4), 187–482.

C. Conclusion

Parmi les neuf extraits aqueux de plantes testés, huit ont présenté des effets significatifs sur la production d'AFB1 sans modulation de la croissance fongique. De plus, six de ces huit extraits (camomille, cumin, feuilles de laurier, romarin, sauge et thym) ont réduit la production d'AFB1 à des niveaux indétectables et ont ainsi montré un effet anti-aflatoxinogène supérieur à celui des huiles essentielles correspondantes, aux concentrations testées. Cette étude a permis de montrer que les extraits aqueux peuvent être une alternative aux huiles essentielles dont les limites d'usage (toxicité, modification des qualités organoleptiques) ont déjà été soulignées.

Dans la suite de notre travail, nous avons donc orienté notre travail vers la caractérisation de l'effet anti-aflatoxinogène d'extraits aqueux, en focalisant plus particulièrement notre attention sur des plantes présentes à l'état endémique dans les régions méditerranéennes, couramment utilisées en médecine traditionnelle sous forme de décoctions et dont l'effet anti-fongique ou anti-toxinogène n'avait pas encore été documenté.

**Chapitre 3 – Caractérisation de l'effet d'un extrait
aqueux d'hysope – *Micromeria graeca*, sur la
synthèse de l'aflatoxine B1**



A. Introduction

L'hysope est une plante médicinale, originaire du bassin Méditerranéen, appartenant à la famille des *Lamiaceae*. Elle est couramment utilisée au Liban en infusion pour ses propriétés aromatiques, expectorantes et anti-inflammatoires (Formisano et al., 2014; Hilan et al., 2011). L'huile essentielle de l'hysope est neurotoxique (crises épileptiques) en cas d'ingestion à des doses élevées (Tisserand and Young, 1996). Au contraire, un extrait aqueux de cette même plante, testé sur des souris, possède un effet gastro-protecteur (réduction des lésions gastriques) grâce à ses propriétés anti-inflammatoires (Abu-Gharbieh et al., 2013).

Bien que les vertus médicinales de l'hysope soient reconnues et souvent utilisées en médecine traditionnelle, ses propriétés antifongiques ou anti-toxinogènes n'ont pas encore été documentées.

Notre étude s'attachera à caractériser l'effet d'un extrait aqueux d'hysope – *Micromeria graeca* sur *A. flavus* et la synthèse de l'aflatoxine B1.

Nous montrons ainsi que cet extrait est capable d'entraîner une inhibition dose-dépendante de la synthèse d'AFB1 qui devient quasi-totale à partir de 10 mg d'extrait/ml de milieu. Cet effet est observé sans réduction ou ralentissement du développement de la souche fongique mais s'accompagne de modifications morphologiques importantes lors de l'examen microscopique de la colonie d'*A. flavus* exposée à l'extrait.

Grâce à l'outil moléculaire élaboré et discuté dans le premier chapitre de ce manuscrit, le mécanisme d'action moléculaire de l'extrait aqueux d'hysope a pu être élucidé. En effet, l'inhibition de la production d'AFB1 s'accompagne d'une modulation négative de tous les gènes de la voie de biosynthèse de cette toxine. L'expression des gènes codant pour les deux co-activateurs internes au cluster *aflR* et *aflS* est significativement réduite et induit une forte répression des autres gènes structuraux du cluster. L'expression de 15 autres gènes régulateurs, externes au cluster, a été modulée par l'ajout de l'hysope dans le milieu. Il s'agit de deux facteurs de transcription globaux VeA et MtfA, coordonnant le métabolisme primaire et secondaire chez les champignons filamenteux, ainsi que de nombreux gènes

intervenant dans la réponse au stress oxydatif. Cela suggère que le mécanisme d'action de l'hysope implique une modulation du stress oxydant qui semble être essentiel à la production d'aflatoxines dans le milieu.

B. Article soumis (*Journal of Natural Products*):**Identification of an anti-aflatoxinogenic aqueous extract from *Micromeria graeca* and elucidation of its molecular mechanism in *Aspergillus flavus***

Rhoda El Khoury^{†,‡}, *Isaura Caceres*[†], *Olivier Puel*[†], *Sylviane Bailly*[†], *Ali Atoui*[§], *Isabelle P. Oswald*[†], *André El Khoury*[‡], *Jean-Denis Bailly*^{*†}

[†] Toxalim, Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP Purpan, UPS, Toulouse, France.

[‡] Laboratoire de Mycologie et Sécurité des Aliments (LMSA), Département de Biochimie, Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph, P.O Box 11- 514, Beirut 1107 2050, Lebanon

[§] Laboratory of Microbiology, Department of Natural Sciences and Earth, Faculty of Sciences I, Lebanese University, Hadath Campus, P.O. Box 5, Hadath, Lebanon.

Corresponding Author

* Jean-Denis Bailly

jd.bailly@envt.fr

23 chemin des capelles

31076, Toulouse, France

Tel.: +33-5-6119-3229

Fax :

ABSTRACT

Amongst all of the food-contaminating mycotoxins, aflatoxins, and mainly aflatoxin B1, emerge as the most toxic and economically-costly. As green agriculture is thriving to replace fungicides, natural preventive strategies are developed to limit crop contamination by these toxic fungal metabolites. In this study, we demonstrated that an aqueous extract of the medicinal plant *Micromeria graeca* - known as hyssop - completely inhibits aflatoxin production by *Aspergillus flavus* without reducing fungal development. The inhibitory mechanism was explored by analyzing the expression of 61 genes including 27 aflatoxin biosynthesis cluster genes and 34 secondary metabolism regulating genes. This analysis revealed a 3-fold down-regulation of *aflR* and *aflS* genes, the two internal cluster co-activators, resulting in a drastic repression of all aflatoxin biosynthesis genes. Hyssop also targeted fifteen regulating genes including *veA* and *mtfA*, two major global-regulating transcription factors. The effect of this extract is also linked to an alteration of a number of oxidative stress-defense genes such as *msnA*, *srrA*, *catA*, *cat2*, *sod1*, *mnsod* and *stuA*. In conclusion, hyssop inhibits AFB1's synthesis at the transcriptomic level. This aqueous extract constitutes a promising natural-based solutions to control AFB1 contamination.

Keywords: Aflatoxin B1, *Aspergillus flavus*, hyssop, inhibition, oxidative stress.

Aspergillus flavus is a saprophytic fungus developing on many crops and mostly maize, oilseed crops such as peanuts, as well as dried fruit and spices¹. It is the main producer of Aflatoxin B1 (AFB1), the most potent naturally occurring carcinogen. AFB1 is also associated with several health-detrimental pathologies mainly targeting the liver^{2,3}. Through endangering food and feed safety, this mycotoxin has major economic repercussions by increasing agricultural losses and threatening animal productivity⁴. These damages are further exacerbated by the globalization of food trade⁵ and the global climate changes^{6,7}.

Many strategies have been developed to limit aflatoxin contamination in crops. Implementing good agricultural practices is undoubtedly a key point to limit an undesirable fungal incidence. Fungal growth and mycotoxin production closely depend on temperature and humidity⁸ and since these meteorological parameters are impossible to control, contamination cannot be completely avoided⁹. Use of fungicides has witnessed a major drawback for their toxic chemical residues accumulate in food products. Their excessive use in crops over the last decades also resulted in the development of resistant pathogen populations as well as the accumulation of toxic chemical residues in water and soil¹⁰.

Since physical degradation after production remains impossible and decontamination attempts are, to date, restricted to animal feed¹¹, the attention has been rather shifted towards more natural ways to prevent AFB1's contamination. For example, a biocontrol approach was developed and consists on the use of micro-organisms, such as strains of soil or lactic acid bacteria and atoxinogenic fungi. Such strains displayed the ability to inhibit aflatoxin production or fungal growth to a certain extent^{12,13}. Natural preventive strategies could also rely on the use of plant extracts or essential oils. Plants produce many metabolites as part of their development or as a defensive strategy in response to a number of environmental stresses. Therefore, plant extracts have long been studied as protective bioactive agents¹⁴⁻¹⁶ and some were characterized as having antifungal or anti-toxinogenic properties¹⁷⁻²⁰.

M. graeca - hyssop - is an herbaceous plant, belonging to the *Lamiaceae* family. It is commonly found in the Mediterranean region and frequently used for medicinal and condimental purposes^{21,22}.

The purpose of this study was to test the aqueous natural extract from *Micromeria graeca* for its ability to prevent aflatoxin's biosynthesis. We observed that hyssop inhibits AFB1's production by *A. flavus* strains without interfering with fungal growth. The molecular mechanism of action of this extract resulted in a down-regulation of all of AFB1's biosynthetic cluster as well as a modulation in the expression of 15 secondary metabolite regulating genes.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of hyssop's aqueous extract on *A. flavus* development and AFB1 production.

When *A. flavus* strain NRRL 62744 was grown in a hyssop-supplemented medium a dose-dependent decrease in AFB1 production was observed. This effect was significant even at the concentration of 0.078 mg/ml (*p*-value 0.0032). At 0.625 mg/ml hyssop's extract inhibits AFB1's production by 52% without altering the growth of *A. flavus*. At a concentration of 10 mg/ml, inhibition was at 99.2% and at 15 mg/ml, AFB1 was no longer detectable (**Figure 1**).

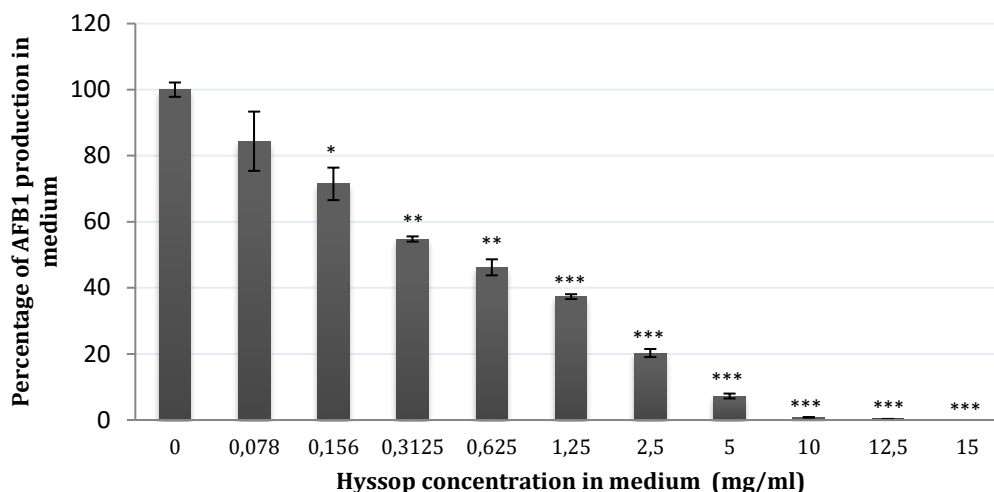


Figure 1. AFB1 production as a function of hyssop concentration. MEA medium was supplemented with increasing concentrations of hyssop's extract between 0.078 -15 mg/ml and cultivated at 27°C, in the dark, for 8 days. AFB1 concentrations were quantified through HPLC/FLD analysis. Results are expressed as mean % \pm SEM (n=3). * p -value < 0.05; ** p -value < 0.01; *** p -value < 0.001.

At 10 mg/ml, aflatoxin inhibition was accompanied by a mild increase of the colony diameter of hyssop-treated cultures (4.4 ± 0.03 vs 4.25 ± 0.03 cm for treated and control respectively, p -value 0.0213). However, no significant increase in the total spore count neither in the spore density was observed following hyssop's addition. Besides, no further change was observed for mycelium weights or for the germination delay in the presence of hyssop in medium (**Table 1**).

Table 1. Effect of 10 mg/ml of hyssop on the development of *A. flavus* i) colony diameter was measured in length and width, ii) weight was measured after a drying step at 60°C for 48 h, iii) germinating conidia were counted by observation under stereo-microscope after 16h incubation at 27°C, iv) total spore count is estimated following a complete wash of conidia and a Malassez-cell count of proper dilutions and v) spore density was calculated based on the total spore count reported to the colony surface. Results are expressed as mean \pm SEM (n=3).

		Culture conditions	
		Control	Hyssop 10 mg/ml
Growth	Colony diameter (cm)	4.25 ± 0.03	4.4 ± 0.03
	Mycelium dry weight (g)	0.16 ± 0.03	0.15 ± 0.02
Sporulation	Germinating conidia after 16h (%)	$96.5 \pm 8.5\%$	$101.5 \pm 4\%$
	Total spore count	$8.1E08 \pm 4.5E07$	$1.1E09 \pm 9.9E07$
	Spore density (conidia/cm ²)	$5.7E07 \pm 2.6E06$	$7E07 \pm 5.6E06$

Following hyssop addition, *A. flavus* colonies presented numerous macro and microscopic modifications. The major macroscopic morphological change noticeable on these colonies was an abundant aerial mycelium layering the entire surface of the colony. This latter also displayed a fasciculated edge. The presence of these numerous floccose tufts also increased the depth of the colony (**Figure 2**).

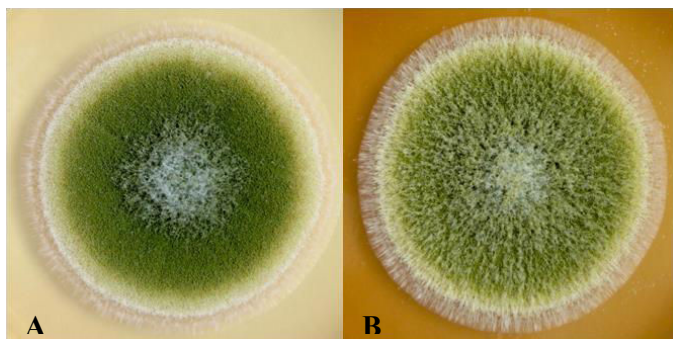


Figure 2. Four-day *A. flavus* strain NRRL 62744 grown in the dark at 27°C. **A.** Control culture grown on a regular MEA medium. **B.** MEA medium was supplemented with hyssop's aqueous solution at 10 mg/ml.

Under microscope, classic *A. flavus* structures were present in the basal mycelium of hyssop-treated cultures: long, coarse, un-branched conidiophores and radiate biseriate conidial heads. However, in the aerial mycelium, conidiophores, vesicles and conidia presented an atypical morphology and organization: i) an increased number of short conidiophores bearing small columnar heads in relation with the abundant aerial mycelium, ii) phialides developing anarchically on hyphae and on conidiophores in the absence of a vesicle (**Figure 3**), iii) presence of conidiophores with two, and less frequently, three fully-sporulated vesicles.

A single previous study has described the modification of the aerial hyphae in an AF-inhibiting profile in *A. parasiticus* in the presence of n-decyl aldehyde, a corn-derived volatile compound²³. Nevertheless, another study conducted on *A. flavus* mutant strains described the appearance of morphological abnormalities, notably on phialide formation, associated to a cessation of AFB1 production²⁴.

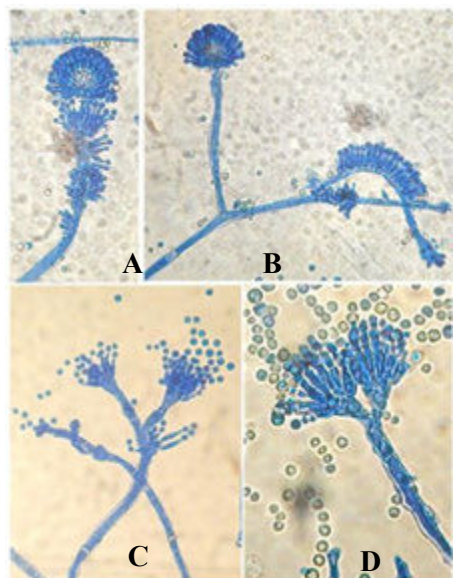


Figure 3. Microscopic views (x400) of conidiophores in the aerial mycelium of *A. flavus* NRRL 62744 showing the development of anarchic phialides when strain was grown on a hyssop-treated MEA medium.

At the dose of 10 mg/ml we observed a 77.7 and 70.8% inhibition of AFB1 production in E28 and E71 *A. flavus* strains respectively without alteration of fungal growth. Similar morphological changes were also observed on these two strains (not shown).

Hyssop's aqueous extract down-regulated the expression of AFB1 cluster genes. In *A. flavus* AFB1's biosynthesis is the result of a coordinated cascade of enzymatic reactions. The enzymes catalyzing these reactions are encoded by 27 genes and grouped in a cluster located in the telomeric region of the 3rd chromosome of aflatoxinogenic species²⁵. Inhibition of AFB1's production in hyssop-supplemented media was accompanied by a decrease in the expression of both of *aflR* and *aflS* genes by 3.2 and 2.8 times respectively (p -value < 0.0001). A down-regulation of these two latter genes has been associated with the repression of the entire AF cluster genes²⁶. Apart from *aflT* (the MFS transporter encoding gene), which is not regulated by the AflR/AflS complex and was down-regulated only by 2.3 times, the expression of all of the other cluster genes was severely repressed. The extent of this repression varied between the different genes and was not linked with the intervention level within AFB1's enzymatic cascade (**Figure 3**).

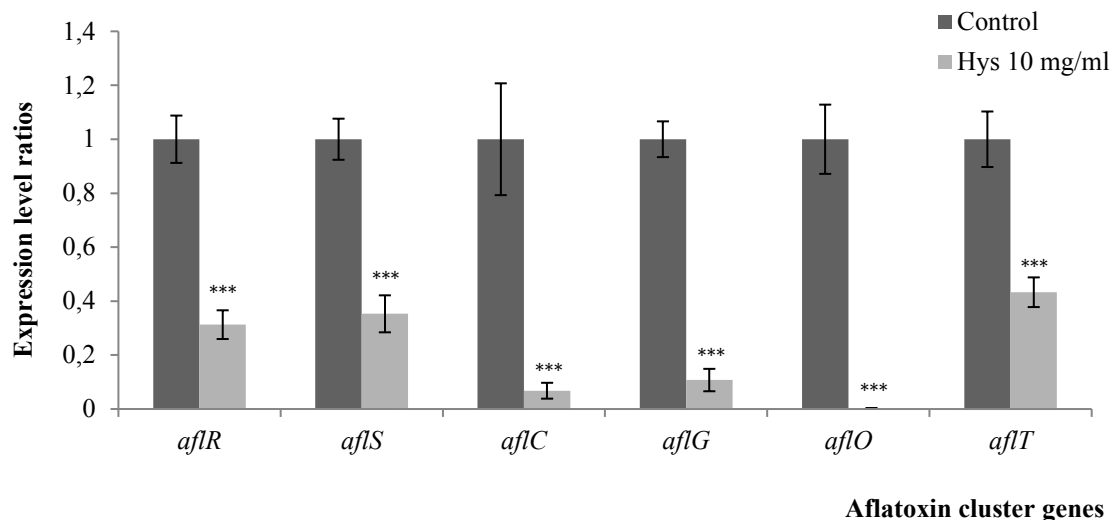


Figure 3. Normalized gene expression ratios of the two internal AF cluster-regulating genes *aflR* and *aflS* as well as *aflC*, *aflG* and *aflO* intervening at the beginning, middle and later stages of the enzymatic cascade, and *aflT* in the presence of hyssop extract (10 mg/ml). *** p -value < 0.001. Results are expressed as mean \pm SEM (n=6).

Genes undergoing the most drastic inhibitions were *hypC*, *aflI* and *aflO* encoding enzymes respectively intervening at the beginning, middle and end of the biosynthetic pathway and with corresponding fold-changes of 167.2, 60.7 and 468.8 with p -values < 0.001. For the genes encoding enzymes involved in the first steps of the cascade leading to the polyketide structure, *aflA*, *aflB* and *aflC*, expression was decreased by 12.2, 12.3 and 14.7 respectively. Genes least impacted are *aflM*, *aflG* and *hypD* with expression levels decreasing by 8.4, 9.3 and 9.4 times respectively. For the rest of the AFB1 cluster genes, a same downward trend was observed with expression levels decreasing by 14 to 50 folds (Table S1). This repression of the entire aflatoxin gene cluster is then directly responsible for inhibiting toxin production upon the presence of hyssop.

Transcriptomic effect of Hyssop's extract on secondary metabolism regulating genes. The expression of AFB1 cluster genes is linked to the presence of regulating factors, encoded by genes outside of the cluster. In order to further investigate the mechanism behind the cluster's inhibition, we conducted a study on the regulatory network affecting secondary metabolism, including 34 genes involved in several fungal functional pathways. Among these, a total of 15 genes involved in diverse cellular mechanisms were modulated by hyssop's aqueous extract (**Figure 4**):

- Global regulating factors such as *veA*, *mtfA*, *nsdC* were affected with expression levels respectively increasing by 3.8, 1.9 and 1.5 folds (p -values < 0.0001, 0.0001 and 0.0122).
- Genes encoding enzymes involved in cellular protection from oxidative stress such as superoxide dismutases (*sod1* and *mnsod*) and catalases (*catA* and *cat2*) had their expression decreased by 1.6, 2, 2.2 and 3 folds respectively (p -values 0.013, 0.0007, 0.004 and < 0.0001). As for other genes intervening the oxidative stress response and encoding transcription factors, notably *msnA* and *srrA*, they had their expression levels increased by 3.2 and 1.4 times with p -values of 0.0126 and 0.0017 respectively.

- *gprK* and *gprH*, encoding G-protein receptors involved in relaying external signals were also affected with *gprK*'s expression increasing by 2 folds (p -value <0.0001) and *gprH*'s decreasing by 2.1 folds (p -value 0.0006).
- The expression of the conidial developmental factor *stuA* was 1.8 times increased (p -value 0.0012).
- A couple of genes encoding environmentally-influenced transcription factors, *areA* and *pacC* were also triggered by the addition of hyssop in medium and their expression levels were respectively increased by 1.7 and 1.6 folds with p -values of 0.0215 and <0.0001 . *ppoC* encoding a fatty acid oxygenase involved in oxylipin production also presented an expression decrease by 1.5 times (p -value 0.003).

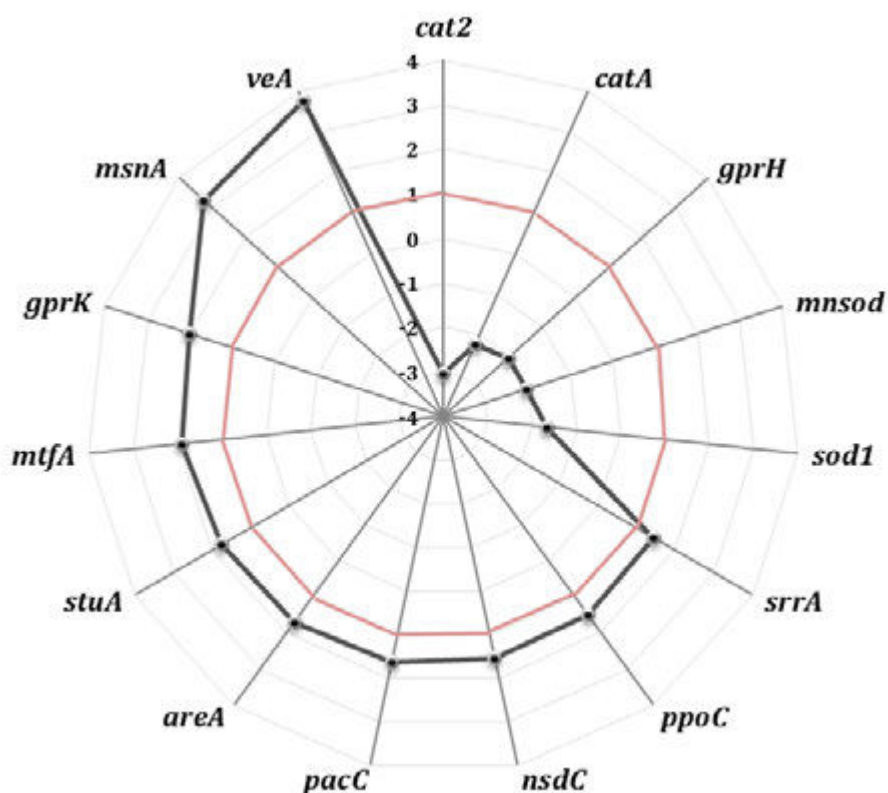


Figure 4. Schematic representation of fold-change ratios of the different regulatory genes affected upon hyssop supplementation of MEA media. The red line represents the expression level of genes set for control cultures and the black one indicates genes' fold change in treated cultures.

VeA is a global regulating transcription factor involved in primary and secondary metabolism²⁷ and recruiting other factors such as LaeA and VelB to form the trimeric velvet complex. The activity of this complex affects fungal development, conidiation and secondary metabolism²⁸. In hyssop-treated cultures, transcripts of *laeA*, *velB* and *vosA*, the latter being an interacting partner of *velB*²⁹, were not affected. This result further highlights the independent role of VeA in multiple other cellular mechanisms³⁰. The presence of VeA is necessary for the expression of secondary metabolite genes however it can also act as a repressor of some of these genes and thus inhibits the production of the concerned metabolite. VeA is essential for the

transcription of AF cluster genes, including the transcription factor *aflR* and others (*aflD*, *aflM* and *aflP*) regulating aflatoxin production. Deletion of the *veA* gene led to the repression of AFB1 cluster genes in *A. flavus*³¹. However according to our current study and to another recent one³², a repression of all AFB1 cluster genes can also coincide with a *veA*-over-expression profile. Such is the case of penicillin, produced by *A. nidulans* where an OE:*veA* led to the repression of *acvA*, the penicillin biosynthesis gene and subsequent inhibition of penicillin production³³.

VeA can also interact with another conserved global transcription factor, MtfA. The latter has a major role in regulating development and secondary metabolism in filamentous fungi³⁴ and it is linked to AFB1's biosynthesis and to *aflR*'s expression. An over-expression of *mtfA* in *A. flavus* has drastically inhibited the production of AFB1 following a down-regulation of *aflR* whereas the effect of an *mtfA* deletion was less important³⁵. The over-expression of *mtfA* in our conditions could result from that of *veA* and the interaction between these two factors would then be responsible for down-regulating AF-cluster genes and inhibiting aflatoxin production.

Besides its role in secondary metabolite regulation, VeA is also a developmental factor regulating morphogenesis as alterations in its expression levels can result in morphological abnormalities. For example, a reduction in fungal aerial hyphae was noted in both *A. flavus*²⁵ and *Fusarium graminearum*³⁶ *veA* deleted strains. Therefore, the modulation of *veA*'s expression could contribute to morphological abnormalities observed upon hyssop exposure.

In the presence of an environmental stress, fungi may establish several defense lines for limiting cellular damages. It has been demonstrated that VeA contributes to a positive transcriptomic modulation of stress-tolerance genes such as *msnA* and *srrA* under induced oxidative stress conditions³⁰. The expression of these two transcription factors is then highly dependent on that of *veA*. Therefore, their over-expression in a hyssop-treated medium might be the outcome of an over-expressed *veA*. The developmental factor StuA has also been associated to stress-response in fungi yet without a clear view on its contribution³⁷. However, evidence exists on its dependence upon *msnA* since its expression levels were modulated in both *A. flavus* and *A. parasiticus msnA*-deletion strains³⁸. MsnA is also known for regulating the expression of the catalases (CAT)- and superoxide dismutases- (SOD)-encoding genes³⁸. Those antioxidant enzymes along with aflatoxin formation are suggested as part of the fungus defense mechanism against reactive oxygen species (ROS) damages^{37,39}. When medium was supplemented with *M. graeca*'s extract, *A. flavus* responded by decreasing the expression of SOD- and CAT-encoding genes such as *sod1*, *mnsod*, *catA* and *cat2* as levels of *msnA* increased thus resulting in an AF-biosynthesis repression, possibly related to an alleviation of environmental oxidative stress.

As for NsdC and PacC, more data is yet to be collected on their individual and possibly collaborative roles in secondary metabolism regulation. NsdC is known to be a developmental regulator which alteration caused several morphological aberrances such as shorter-stipe conidiophores presenting abnormal conidial-head formations. So, as for VeA, its modulation could participate to the morphological modifications observed in hyssop-exposed cultures. It has also been linked to aflatoxin cluster-gene expression²⁴ as well as being a global regulator of secondary metabolism⁴⁰. As for PacC, a pH-dependent factor, its over-expression in aflatoxin-repressive conditions is to be investigated especially that pH conditions are neither alkaline thus suitable for its activation nor varying between control and hyssop-treated media (data not shown).

Alterations in morphology, such as aerial hyphae development, were also associated to an imbalance in the G-protein signal transduction pathway^{41,42}. This pathway is governed by the binding of signaling molecule to G-protein coupled receptors (GPCR) such as those encoded by *gprK* and *gprH* and tuned by regulators of the G-protein signaling cascade (RGS), which roles and implication in AFB1's synthesis are being investigated in *A. flavus*⁴⁰. G-protein signaling pathway is also linked to oxylipins that are hormonal-like signaling molecules⁴³ produced by fatty-acid-oxygenases such as PpoC. Moreover, oxylipins' regulation has also been described as VeA-dependent²⁷. However, since fungal signal perception and transduction pathways is a very complex loop due to the diversity of signals that might be initiating it and most importantly to the numerous acting factors involved downstream any signal perception and since *M. graeca*'s extract is a complex extract containing many signal-provoking agents such as polysaccharides, amino acids, minerals, phenolic compounds and many others, it is possible that morphological modifications have no direct link with AFB1 inhibition.

In conclusion, this study demonstrates the efficiency of *Micromeria graeca*'s aqueous extract to limit AFB1 contamination without altering fungal growth. Such an effect could ensure food safety without affecting biodiversity. Indeed, *A. flavus* is a very competitive crop-contaminating agent; therefore, use of fungistatic agents could favor the emergence of other and possibly uncontrollable microorganisms. According to our results, inhibition by hyssop's extract occurs at a transcriptomic level as expression ratios of all of aflatoxin cluster-genes were severely decreased. Nonetheless, hyssop's extract triggered a response in several fungal cellular mechanisms including cellular signaling, global transcription factors, conidial development and factors intervening in the oxidative stress response. Being as complex as it is, this extract may shelter several bioactive compounds⁴⁴ complementarily contributing to its anti-aflatoxinogenic activity. For a more accurate determination of the inhibitory mechanism of action, the content of this extract needs to be deciphered in order to determine and purify its active molecules and the inhibition extent of each of the isolated compounds.

GENERAL EXPERIMENTAL PROCEDURE

Solvents and standards. All solvents were HPLC grade and purchased from ThermoScientific Fisher (Villebon-Sur-Yvette, France). Lyophilized aflatoxin B1 standard was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Stock solutions of each of the standards were prepared in methanol and stored at 4°C in the darkness. Calibration curves were prepared before use by diluting stock solutions with mobile phase used for HPLC analysis.

Preparation of the aqueous solution of hyssop. Dried hyssop (*Micromeria graeca*) was commercially purchased from Tyr, Lebanon. Hyssop's species was kindly confirmed by Pr Marc Beyrouthy (Department of Agricultural Sciences, USEK - Lebanon). Leaves were grinded with an electrical grinder and ten grams of ground hyssop were added to 80 ml of bi-distilled water and placed on a horizontal shaking table at 220 rpm for 24 hours. Extracts were then filtered through cotton gauze before being centrifuged for 10 min at 3,500 rpm. Filtrates were centrifuged once again, at 4,700 rpm for 30 min and autoclaved at 121°C for 15 min. Final sterile extracts were stored at +4°C until their use.

Fungal strains and growth conditions. A referenced toxinogenic *Aspergillus flavus* strain (NRRL 62477) isolated from paprika samples harvested from Moroccan market⁴⁵, was used to evaluate aflatoxin inhibition by hyssop's aqueous solution as well as the molecular mechanism of inhibition. Further analysis of total aflatoxin inhibition by the aqueous hyssop solution were conducted on two other *A. flavus* strains (E28 and E71) that were previously isolated by our team from white pepper and paprika samples from Morocco⁴⁵.

Strains were cultivated on a malt extract agar (MEA) medium (30 g malt extract and 15 g agar-agar per liter) (Biokar Diagnostics, Allone, France), supplemented at 2% v/v with an aqueous hyssop (*M. graeca*) solution whereas water-supplemented media were used as control cultures. Media for RNA isolation and dry weight measurement were layered with 8.5 cm diameter cellophane disks (Hutchinson, Chalette-sur-Loing, France) before inoculation in order to allow separation of mycelium for culture medium. Spore suspensions were prepared in Tween 80 (0.05% in water) from a one-week-old MEA culture. Spores were counted on a Malassez cell and 10^3 spores were inoculated in the center of the medium. Cultures were incubated at 27°C and those destined for RNA isolation were incubated in 6 replicates for four days. For AFB1 quantification assays, cultures were incubated for 8 days and were in triplicates. Media pH was measured before and after inoculation and after incubation using a H199161 food pH-meter (Hanna Instruments, Tanneries, France)

Examination of cultural parameters.

Effect on growth. The final growth mean was estimated by the measurement of culture diameters in length and width at day 4.

Mycelium dry weight. Following a 4-day incubation period, cellophane disks were peeled off and placed in new petri dishes that were incubated for 48 hours at 60°C. Dried mycelium films were allowed to cool in a desiccator before being weighed on an analytical balance. Final weight was calculated by subtracting the mean weight of 4 desiccated control cellophane disks.

Total spore quantification. Colonies were cut out of MEA media, 1 mm beyond the mycelium border, placed in a stomacher bag with 50 ml of Tween 0.05% and spores were gently manually scraped off of culture without tearing the media. The bag was then placed in a stomacher for 90 s. The supernatant was filtered through cotton gauze that was then rinsed with 3x20 ml Tween 0.05%. Spore solutions were homogenized by thorough vortex and subsequent dilutions were prepared in Tween 0.05% for counting on a Malassez cell in order to determine the total spore count (SC). Spore density (SD) was calculated as $SD = SC/(\pi r^2)$, r = average colony radius.

Delay to germination. Two hundred spores were inoculated in the center of media and germinating spores were counted after a 16-hour incubation period at 27°C by stereo-microscopic examination.

Morphological features of fungi. Macroscopic (colour of conidial areas, thallus margin and texture, aspect of conidial heads and colony reverse...) and microscopic (conidiophore, shape of vesicles, number of sterigmata, shape of conidia, ornamentation...) characters were observed under stereomicroscope (Olympus SZX9 –X12-120) and optical microscope (Olympus CX41 –X400 and X1000) respectively.

RNA isolation and reverse transcription. Cellophane disks along with the 4-day mycelium were peeled off from medium, finely grinded with liquid nitrogen and a maximum of 100 mg were used for total RNA purification through a RNeasy Plus Minikit (Qiagen, Hilden, Germany) that includes an on-column genomic DNA clean-up, following the manufacturer's

instructions. RNA integrity and purity were checked with agarose gel electrophoresis and a NanoDrop ND1000 (Labtech, Palaiseau, France) that also determined its concentration. First-strand cDNA synthesis reaction was primed using RevertAid Reverse Transcriptase (MBI Fermentas, UK), RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Warrington, UK) and an anchored oligo(dT) Bys 3' Primer (5'-GCTGTCAACGATACGCTAACGTAACGGCATGACAGTGTTT TTTTTTTTTTTTTT-3'). An RT minus sample, where no reverse transcriptase reaction takes place, and a sterile water sample were added as negative controls to verify the absence of undesirable genomic DNA contamination and primer complementation, respectively.

Real-time PCR expression profile analysis of genes regulating the aflatoxin B1 biosynthesis in *A. flavus*. The genome of *A. flavus* strain NRRL 3357 (GenBank accession number EQ963478) served as a matrix for all of the primer used in this study. All of the primer pair sequences were adapted from a previous work³² and primer sequences of the *stuA* gene (AFLA_046990) were added in this study (*stuA_F*: GATAAACGGAACCAAACTGCTCAA; *stuA_R*: CACGCTCAAATGGGATCCAA). Primer pairs design was based on the coding sequence of the corresponding genes, with at least one of the primers extending on an exon/exon junction in order to avoid undesirable genomic DNA amplification. Primer-dimer or self-complementarities were evaluated using the PrimerExpress 2.0 software (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). All primers were synthesized by Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Following RNA extractions and reverse transcriptase reactions, real-time PCR assays were performed on 15 ng cDNA in a 5 µl reaction volume per well, using Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) as a fluorescent dye for cDNA quantification. Master mixes and diluted cDNA samples were prepared separately on 96-well Sorenson plates (VWR, Pennsylvania, United States) and mixed in 384-well plates by an Agilent Bravo Automated Liquid Handling Platform (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States). All real time amplification reactions were carried out on a ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Warrington, UK), as described by Tannous *et al.*, 2014. In total, the expression of 61 genes was simultaneously analyzed, 27 of which corresponded to AFB1 cluster and 34 to regulatory factors.

Aflatoxin extraction and HPLC quantification. Media of 4 and 8-day cultures were entirely retrieved and their AFB1 content determined after extraction with 25 and 40 ml chloroform respectively. Extracts were held for 2 hours on a horizontal shaking table at 200 rpm and were then filtered through a Whatman 1PS phase separator filter (GE Healthcare, UK, 150 mm diameter). Filtrates were evaporated to dryness and dissolved in 1 ml of a water-acetonitrile-methanol mixture (65:17.5:17.5; v/v/v). Extracts were filtered using 0.45 µm porosity disks (Thermo Scientific Fisher, Villebon-Sur-Yvette, France) before analysis. HPLC analysis was performed using a Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Scientific, France) using a 125 x 2 mm, 5 µm, 100 Å, Luna® C18(2) LC column (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Aflatoxins were separated using the program described by Fu, Huang, & Min, 2008⁴³, with minor modifications. A mixture of water (acidified with 0.2% acetic acid)-acetonitrile (79:21, v/v) is eluent A and methanol is eluent B. Separation program consists of a 30 min A:B (82.5:17.5) isocratic flow at 0.2 ml/min. Aflatoxins were detected using a fluorescent detector at wavelengths of 365/430 nm (excitation/emission). UV Spectra were confirmed by an additional diode array detector (DAD) coupled to the apparatus. Sample concentrations were calculated based on a standard calibration curve.

Acknowledgements. The authors would like to thank Pr. Marc Beyrouthy (Department of Agricultural Sciences, USEK – Lebanon) for identifying the species of the hyssop plant used in this study. This work was funded by the projects Aflafree (ANR-11-ALID-0003), Aflared (joint project, 001-2012 STDF-AIRD), and ToxinFree (Campus France PHC cèdre 32763). The authors would also like to thank the Agence Nationale de la Recherche (ANR) and the Research Council of Saint-Joseph University (Lebanon), the two organizations funding the doctoral studies of Rhoda El Khoury. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abbreviations. AF Aflatoxin; AFB1 Aflatoxin B1; CAT Catalase; FLD Fluorescence detector; GPCR G-protein receptors; HPLC High performance liquid chromatography, MEA Malt extract agar, MFS Major Facilitator Superfamily, RGS Regulator of G-protein Signaling, SEM Standard Error of the Mean, SOD Superoxide dismutase.

Conflict of Interest Disclosure. The authors declare no competing financial interest.

References

- (1) Klich, M. A. *Mol. Plant Pathol.* **2007**, 8 (6), 713–722.
- (2) Wu, F.; Groopman, J. D.; Pestka, J. J. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2014**, 5, 351–372.
- (3) Cano, P.; Puel, O.; Oswald, I. P. In *Fungi Applications and Management Strategies*; Deshmukh, S. K., Misra, J. K., Tewari, J. P., Papp, T., Eds.; CRC Press **2016**, 318–371.
- (4) Bryden, W. L. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2012**, 173 (1-2), 134–158.
- (5) Wu, F.; Guclu, H. *PLoS One* **2012**, 7 (9), e45151.
- (6) Magan, N.; Medina, A.; Aldred, D. *Plant Pathol.* **2011**, 60 (1), 150–163.
- (7) Cotty, P. J.; Jaime-Garcia, R. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, 119, 109–115.
- (8) Medina, A.; Rodriguez, A.; Magan, N. *Front. Microbiol.* **2014**, 5, 348.
- (9) Hell, K.; Mutegi, C. *African J. Microbiol. Res.* **2011**, 5 (5), 459–466.
- (10) Da Cruz Cabral, L.; Fernández Pinto, V.; Patriarca, A. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, 166 (1), 1–14.
- (11) Huwig, A.; Freimund, S.; Käppeli, O.; Dutler, H. *Toxicol. Lett.* **2001**, 122 (2), 179–188.
- (12) Oliveira, M. D. S.; Furlong, E. B. *World Mycotoxin J.* **2008**, 1 (2), 139–146.
- (13) Dalié, D. K. D.; Deschamps, a. M.; Richard-Forget, F. *Food Control* **2010**, 21 (4), 370–380.
- (14) Cassady, J. M.; Baird, W. M.; Chang, C. J. *J. Nat. Prod.* **1990**, 53 (1), 23–41.
- (15) Gomez-Flores, R.; Hernández-Martínez, H.; Tamez-, P.; Tamez-Guerra, R.; Quintanilla-Licea, R.; Monreal-Cuevas, E.; Rodriguez-Padilla, C. *J. Nat. Prod.* **2010**, 3, 54–63.
- (16) Ashour, M.; Yehia, H. M.; Proksch, P. *J. Nat. Prod.* **2011**, 4, 108–114.
- (17) Kohiyama, C. Y.; Yamamoto Ribeiro, M. M.; Mossini, S. A. G.; Bando, E.; Bomfim, N. D. S.; Nerilo, S. B.; Rocha, G. H. O.; Grespan, R.; Mikcha, J. M. G.; Machinski, M. *Food Chem.* **2015**, 173, 1006–1010.
- (18) Matan, N.; Matan, N. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2008**, 62 (1), 75–78.
- (19) Prakash, B.; Singh, P.; Kedia, A.; Dubey, N. K. K. *Food Res. Int.* **2012**, 49 (1), 201–208.
- (20) Sun, Q.; Wang, L.; Lu, Z.; Liu, Y. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2015**, 104, 419–425.
- (21) Abu-Gharbieh, E.; Shehab, N. G.; Khan, S. A. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2013**, 26 (4), 799–803.
- (22) Bakkour, Y.; Alwan, S.; Soufi, H.; El-Ashi, N. *J. Nat. Prod.* **2012**, 5, 116–120.
- (23) Wright, M. S.; Greene-Mcdowelle, D. M.; Zeringue, H. J.; Bhatnagar, D.; Cleveland, T. E.

- Toxicon* **2000**, 38 (9), 1215–1223.
- (24) Cary, J. W.; Harris-Coward, P. Y.; Ehrlich, K. C.; Mack, B. M.; Kale, S. P.; Larey, C.; Calvo, A. M. *Eukaryot. Cell* **2012**, 11 (9), 1104–1111.
- (25) Georgianna, D. R.; Payne, G. A. *Fungal Genet. Biol.* **2009**, 46 (2), 113–125.
- (26) Holmes, R. A.; Boston, R. S.; Payne, G. A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 78, 559–572.
- (27) Calvo, A. M. *Fungal Genet. Biol.* **2008**, 45 (7), 1053–1061.
- (28) Bayram, O.; Braus, G. H. *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, 36 (1), 1–24.
- (29) Bayram, O.; Krappmann, S.; Ni, M.; Bok, J. W.; Helmstaedt, K.; Valerius, O.; Braus-Stromeyer, S.; Kwon, N.-J.; Keller, N. P.; Yu, J.-H.; Braus, G. H. *Science*. **2008**, 320, 1504–1506.
- (30) Baidya, S.; Duran, R. M.; Lohmar, J. M.; Harris-Coward, P. Y.; Cary, J. W.; Hong, S.-Y.; Roze, L. V.; Linz, J. E.; Calvo, A. M. *Eukaryot. Cell* **2014**, 13 (8), 1095–1103.
- (31) Duran, R. M.; Cary, J. W.; Calvo, A. M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 73 (5), 1158–1168.
- (32) Caceres, I.; Khoury, R. El; Medina, Á.; Lippi, Y.; Naylies, C.; Atoui, A.; Khoury, A. El; Oswald, I. P.; Bailly, J.-D.; Puel, O. *Toxins (Basel)*. **2016**, 8 (5), 123.
- (33) Sprote, P.; Brakhage, A. A. *Arch Microbiol* **2007**, 188 (1), 69–79.
- (34) Ramamoorthy, V.; Dhingra, S.; Kincaid, A.; Shantappa, S.; Feng, X.; Calvo, A. M. *PLoS One* **2013**, 8 (9), 1–16.
- (35) Zhuang, Z.; Lohmar, J. M.; Satterlee, T.; Cary, J. W.; Calvo, A. M. *Toxins (Basel)*. **2016**, 8 (29), 1–16.
- (36) Jiang, J.; Liu, X.; Yin, Y.; Ma, Z. *PLoS One* **2011**, 6 (11).
- (37) Hong, S.-Y.; Roze, L. V.; Linz, J. E. *Toxins (Basel)*. **2013**, 5 (4), 683–702.
- (38) Chang, P.-K.; Scharfenstein, L. L. L.; Luo, M.; Mahoney, N.; Molyneux, R. J.; Yu, J.; Brown, R. L.; Campbell, B. C. *Toxins (Basel)*. **2011**, 3 (1), 82–104.
- (39) Hong, S.-Y.; Roze, L. V.; Wee, J.; Linz, J. E. *Microbiologyopen* **2013**, 2 (1), 144–160.
- (40) Gilbert, M. K.; Mack, B. M.; Wei, Q.; Bland, J. M.; Bhatnagar, D.; Cary, J. W. *Microbiol. Res.* **2016**, 182, 150–161.
- (41) Yang, Q.; Borkovich, K. A. *Genetics* **1999**, 151 (1), 107–117.
- (42) Han, K. H.; Seo, J. a.; Yu, J. H. *Mol. Microbiol.* **2004**, 53 (2), 529–540.
- (43) Brodhagen, M.; Keller, N. P. *Mol. Plant Pathol.* **2006**, 7 (4), 285–301.

- (44) Loizzo, M. R.; Saab, A. M.; Tundis, R.; Menichini, F.; Bonesi, M.; Piccolo, V.; Statti, G. A.; de Cindio, B.; Houghton, P. J.; Menichini, F. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *119*, 109–116.
- (45) EL Mahgubi, A.; Bailly, S.; Tadrist, S.; Querin, A.; Ouadia, A.; Oswald, I. P.; Bailly, J.-D. *Food Control* **2013**, *32* (1), 143–148.
- (46) Tannous, J.; El Khoury, R.; Snini, S. P.; Lippi, Y.; El Khoury, A.; Atoui, A.; Lteif, R.; Oswald, I. P.; Puel, O. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *189*, 51–60.
- (47) Fu, Z.; Huang, X.; Min, S. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1209*, 271–274.

Supplementary Materials: Identification of an anti-aflatoxinogenic aqueous extract from *Micromeria graeca* and elucidation of its molecular mechanism in *Aspergillus flavus*

Rhoda El Khoury, Isaura Caceres, Olivier Puel, Sylviane Bailly, Ali Atoui, Isabelle P. Oswald, André El Khoury and Jean-Denis Bailly

Table S1. Gene expression ratio values of AFB1 cluster genes upon hyssop addition. Ratios are obtained in comparison to control values.

Gene	Gene expression ratio	SEM	Fold change	p-value
<i>aflR</i>	0.31	0.053	3.2	< 0.0001
<i>aflS</i>	0.35	0.069	2.8	< 0.0001
<i>aflT</i>	0.43	0.055	2.3	< 0.0001
<i>aflA</i>	0.08	0.019	12.2	< 0.0001
<i>aflB</i>	0.08	0.018	12.3	< 0.0001
<i>aflC</i>	0.07	0.029	14.7	0.00058
<i>hypC</i>	0.01	0.003	167.2	< 0.0001
<i>aflD</i>	0.06	0.022	16.8	< 0.0001
<i>aflE</i>	0.06	0.019	17.8	< 0.0001
<i>aflG</i>	0.11	0.042	9.3	< 0.0001
<i>aflH</i>	0.04	0.011	24.8	< 0.0001
<i>aflI</i>	0.02	0.007	60.7	0.00043
<i>aflV</i>	0.05	0.012	19.8	< 0.0001
<i>aflJ</i>	0.06	0.020	18.0	< 0.0001
<i>aflK</i>	0.07	0.019	14.9	< 0.0001
<i>aflL</i>	0.05	0.015	19.2	< 0.0001
<i>aflM</i>	0.12	0.053	8.4	0.00120
<i>aflN</i>	0.03	0.010	34.0	< 0.0001
<i>aflX</i>	0.02	0.008	50.4	< 0.0001
<i>aflO</i>	0.00	0.000	468.8	< 0.0001
<i>aflP</i>	0.03	0.010	29.7	< 0.0001
<i>aflQ</i>	0.07	0.027	13.4	< 0.0001
<i>hypB</i>	0.03	0.016	35.8	0.00085
<i>aflW</i>	0.07	0.019	14.7	< 0.0001
<i>aflY</i>	0.02	0.009	45.8	< 0.0001
<i>hypD</i>	0.11	0.024	9.4	< 0.0001
<i>hypE</i>	0.05	0.011	18.5	0.00018

C. Données supplémentaires à l'étude

Après avoir caractérisé l'effet inhibiteur de l'extrait aqueux d'hysope chez *A. flavus*, nous nous sommes attachés à étudier cet effet chez d'autres espèces aflatoxinogènes de la section *Flavi* afin de voir si cet effet était spécifique de l'espèce fongique.

Ces essais ont permis de mettre en évidence des différences de réponse chez certaines souches, ce qui nous a conduits à étudier l'impact de l'hysope sur l'expression des gènes régulateurs chez une souche résistante à l'inhibition afin de comparer les mécanismes d'action avec la souche sensible préalablement étudiée.

Une étude morphologique comparant les aspects macro- et microscopiques des souches sensibles et résistantes a également été réalisée afin de mettre en évidence un éventuel lien de cause à effet entre les modifications morphologiques observées et l'inhibition de l'aflatoxine.

1. Matériel et Méthode

1.1. Souches et conditions de culture

Les souches supplémentaires utilisées pour cette étude sont les suivantes :

- 3 souches d'*A. parasiticus* : NCPT211 (NRRL5862), NCPT186 (NRRL502), NCPT262 (NRRL492), qui nous ont été cédées gracieusement par l'USDA, États Unis.
- 2 souches d'*A. novoparasiticus* : NCPT249 (AFc32) isolée du manioc du Bénin (Adjovi et al., 2014) et NCPT277 (LEMI 149IOP/ CBS 126850) isolée de l'air d'environnement hospitalier au Brésil (Gonçalves et al., 2012).
- 2 souches d'*A. minisclerotigenes* : NCPT224 (E44), NCPT226 (E74), isolées respectivement de poivre blanc et de paprika du Maroc (El Mahgubi et al., 2013).
- 1 souche d'*A. arachidicola* : NCPT268 (CBS117614)
- 1 souche d'*A. parvisclerotigenus* : NCPT253 (AFc36), isolée du Manioc du Bénin (Adjovi et al., 2014).
- 1 souche d'*A. flavus* E71, isolée de paprika du Maroc (El Mahgubi et al., 2013).

Toutes ces souches ont été cultivées sur du milieu MEA supplémenté par de l'extrait aqueux d'hysope à 10 mg/ml de milieu. Mille spores ont été inoculées en point central et les cultures ont été incubées à 27°C pendant 8 jours. L'extraction des aflatoxines et la quantification par HPLC ont eu lieu selon la méthode décrite dans l'étude précédente.

1.2. Analyse de l'expression des gènes

L'étude de l'expression des gènes a été réalisée sur des cultures de 4 jours sur du milieu MEA supplémenté ou non par de l'hysope. Chaque condition de culture a été répliquée 6 fois. Le protocole d'extraction d'ARN et de RT-qPCR ainsi que l'analyse de l'expression des gènes ont été réalisées comme décrit précédemment.

1.3. Etude morphologique

Deux souches d'*A. flavus* (E73 et E71) et deux souches d'*A. parasiticus* (NCPT262 et NCPT211) ont été utilisées pour l'étude morphologique. Après culture sur MEA supplémenté ou non par l'extrait aqueux d'hysope, un examen macro- et microscopique des colonies a été réalisé afin de mettre en évidence la présence des modifications décrites précédemment sur la souche E73 exposée à l'hysope.

2. Résultats

2.1. Inhibition de la production d'aflatoxines par l'extrait aqueux d'hysope chez des espèces de la section *Flavi*

Dans toutes les espèces testées, l'addition de 10mg/ml d'extrait aqueux d'hysope n'a pas entraîné de modification significative de la croissance fongique évaluée par le diamètre des colonies après 4 jours de culture (résultats non montrés).

Les résultats sur la production d'aflatoxines sont récapitulés dans la **Figure 16** ci-après. Une inhibition quasi-totale de la production des 4 aflatoxines (B1, B2, G1 et G2) a été observée chez deux souches d'*A. parasiticus* : NCPT186 (100% d'inhibition pour les 4 AFs) et NCPT262 (95,9; 97,6 ; 100 ; 100% d'inhibition pour les aflatoxines B1, B2, G1 et G2 respectivement). Une inhibition significative a également été observée chez les deux

espèces d'*A. novoparasiticus* NCPT249 (67,9; 77,1; 88,3% pour les AFB1, B2 et G1 respectivement) et NCPT277 (86,3; 90,4; 94,6% pour les AFB1, B2 et G1 respectivement) et d'*A. minisclerotigenes* NCPT224 et NCPT226. Pour ces deux dernières espèces, l'inhibition des AFB est supérieure à 80% et celle des AFG est très légèrement inférieure avec des inhibitions moyennes de 75 et 74% pour les AFG1 et G2 respectivement. Les espèces d'*A. parvisclerotigenus* NCPT253 et *A. arachidicola* NCPT268 sont moins sensibles à l'effet de l'extrait d'hysope avec des inhibitions de l'ordre de 30% pour l'AGB1, 55% pour l'AFB2, 23% pour l'AFG1 et 40% pour l'AFG2.

La souche d'*A. parasiticus* NCPT211 apparaît, quant à elle, résistante à l'effet de l'hysope puisque pour cette souche nous avons observé, après culture en présence d'extrait aqueux d'hysope une augmentation de la production d'aflatoxines B1 et B2 et une inhibition inférieure à 20% de la production des aflatoxines G1 et G2.

Afin de comprendre les mécanismes à l'origine de la résistance de la souche d'*A. parasiticus* (et valider le mécanisme d'action de l'extrait d'hysope identifié précédemment chez *A. flavus*) nous avons étudié l'impact de l'extrait aqueux d'hysope sur l'expression des facteurs de régulation de la voie de biosynthèse de l'AFB1 ainsi que sur la morphologie de la souche NCPT211.

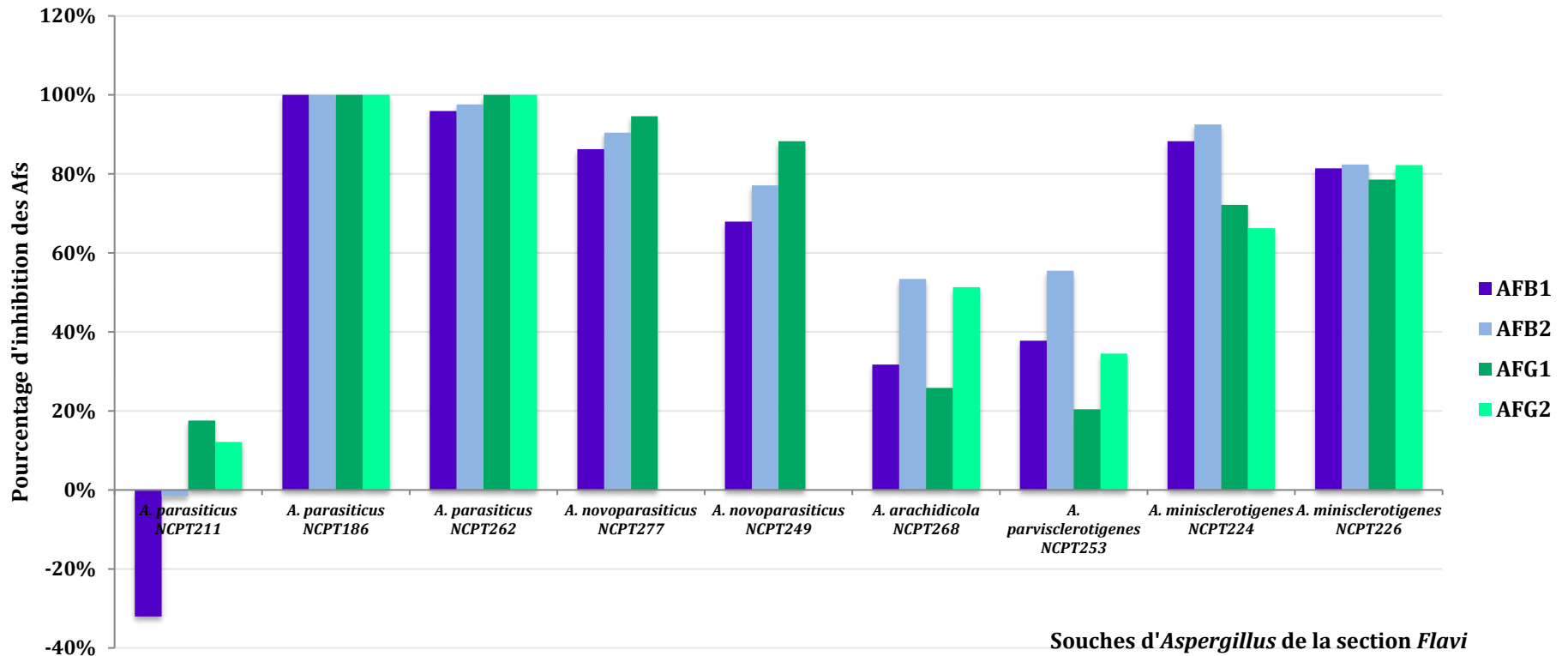


Figure 16. Pourcentages d'inhibition de production des 4 aflatoxines de différentes souches d'*Aspergillus* de la section *Flavi* sur un milieu MEA supplémenté par de l'hysope à 10 mg/ml, cultivé pendant 8 jours à 27°C.

2.2. Comparaison de la modulation des gènes d'intérêt entre *A. flavus* et la souche résistante d'*A. parasiticus*

L'extrait aqueux d'hysope est un extrait complexe, constitué de plusieurs composés pouvant déclencher une réponse cellulaire et des modifications au niveau transcriptomique qui peuvent ne pas être forcément liés à son effet anti-aflatoxinogène. Afin de repérer les gènes impliqués dans le mécanisme d'action de l'extrait aqueux d'hysope, la souche résistante d'*A. parasiticus* NCPT211 est mise à profit pour une analyse de l'expression des gènes d'intérêts modulés chez *A. flavus*. La **Figure 17** représente les ratios d'expression des gènes observés chez *A. flavus* et la souche résistante d'*A. parasiticus*.

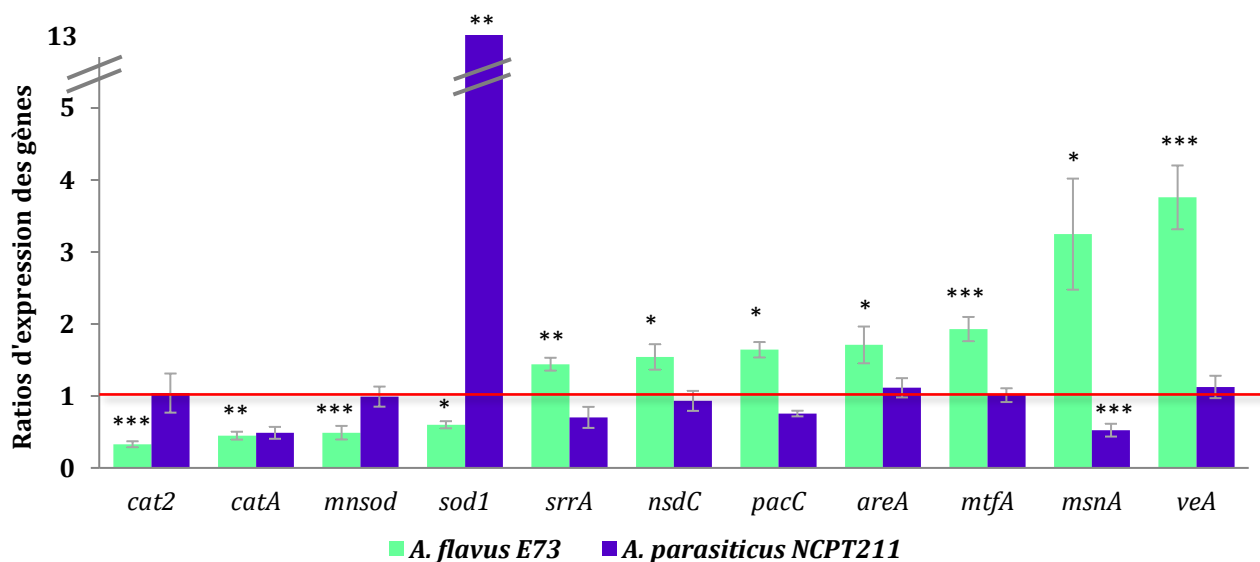


Figure 17. Comparaison des ratios d'expression des gènes modulés chez *A. flavus* E73, sensible à l'inhibition par l'extrait aqueux, et *A. parasiticus* NCPT211, résistant à cet effet. La ligne rouge représente le niveau basal d'expression chez les cultures témoins correspondantes aux deux souches. * p-value < 0.05; ** p-value < 0.01; *** p-value < 0.001.

Les niveaux d'expression des gènes codant les deux facteurs de transcription globaux *mtfA* et *veA* ne sont pas modulés chez la souche résistante, confirmant le rôle pivot que jouent ces gènes dans la régulation de la biosynthèse des aflatoxines et leur inhibition dans un milieu supplémenté d'extrait aqueux d'hysope.

Cet effet différentiel est également observé pour les gènes codant MsnA et SrrA, deux facteurs régulateurs intervenant dans la réponse au stress oxydatif. De plus, la modulation de l'expression des gènes codant pour des superoxyde dismutases et catalases, dépendants de MsnA et SrrA, n'a pas été modulée de manière similaire chez ces deux souches. Ainsi les niveaux d'expression de *cat2*, *catA* et *mnsod* n'ont pas été significativement modulés chez la souche résistante alors qu'ils ont été sous-exprimés chez la souche sensible *A. flavus*. L'expression du gène *sod1* a été fortement sur-exprimée chez la souche résistante, cependant le niveau d'expression basal de ce gène est déjà très faible chez le témoin négatif de cette souche comparé à celui d'*A. flavus*. Une modification mineure du niveau d'expression chez la culture d'*A. parasiticus* supplémentée par l'extrait d'hysope pourrait dans ce cas paraître plus accentuée.

2.3. Dissociation des altérations morphologiques de l'inhibition des aflatoxines suite à l'ajout de l'extrait d'hysope

Les modifications morphologiques décrites chez la souche d'*A. flavus* E73 ont été également observées chez les trois autres souches testées, entre autres la souche résistante.

Pour les souches d'*A. flavus* : les aspects sont représentés dans la **Figure 18**. Au niveau macroscopique, les colonies sont globalement plus vertes, plus sporulées avec un diamètre légèrement supérieur (E73) ou identique (NCPT 219). Dans le mycélium basal, les têtes sont radiées et semblent plus tassées, plus nombreuses et de couleur plus foncée. Quant au mycélium aérien, il est plus fasciculé, et plus étendu sur toute la colonie. En surface, ce mycélium est très fin et présente un aspect désordonné ; plus sporulé avec de petites têtes portant des chaînes de spores divergentes. Au niveau microscopique, le mycélium basal ne présente pas de modifications entre les cultures témoins et celles où le milieu a été supplémenté par l'hysope ; on y retrouve de grosses têtes radiées bisériées. Tandis que dans le mycélium aérien, des déformations apparaissent au niveau des vésicules et certaines présentent des têtes bicéphales ; de nombreuses phialides sont aberrantes et peuvent être isolées sur les hyphes.

Ce même constat a été observé aux niveaux macro- et microscopiques chez les souches d'*A. parasiticus*, sensible NCPT262 (**Figure 19**) et résistante à l'inhibition par l'hysope NCPT211 (**Figure 20**). Cet effet n'est donc pas spécifique à l'espèce et ne peut être couplé à l'inhibition de la production d'aflatoxines.

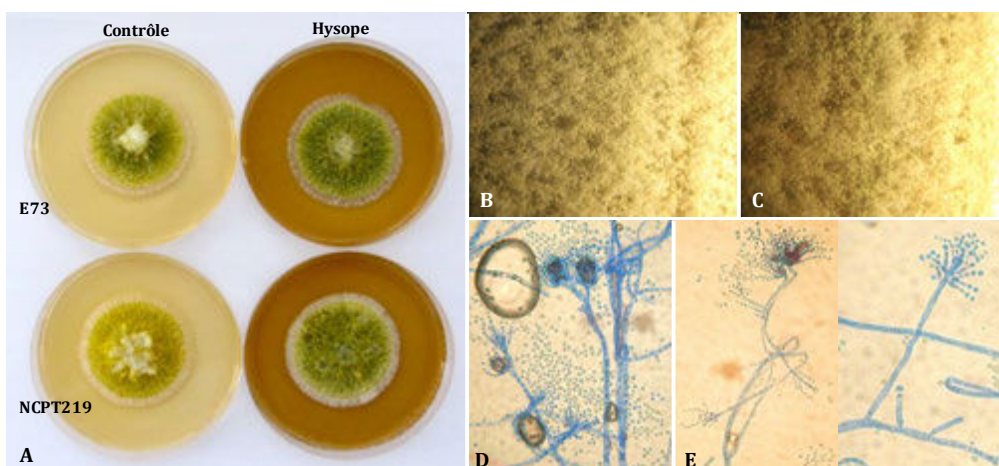


Figure 18. Altérations morphologiques observées chez les souches d'*A. flavus* cultivées 5 jours à 27°C. **A.** Aspect macroscopique des colonies d'E73 et NCPT219 sur du MEA contrôle et supplémenté à 10 mg/ml d'hysope. **B.** Vue à la loupe binoculaire du mycélium périphérique d'une culture témoin sur MEA de NCPT219. **C.** Vue à la loupe binoculaire du mycélium périphérique d'une culture de NCPT219 sur MEA + hysope. **D.** Vue microscopique (400x) des conidiophores d'E73 sur MEA + hysope. **E.** Vue microscopique (400x) des conidiophores de NCPT219 sur MEA + hysope (photos S. Bailly).

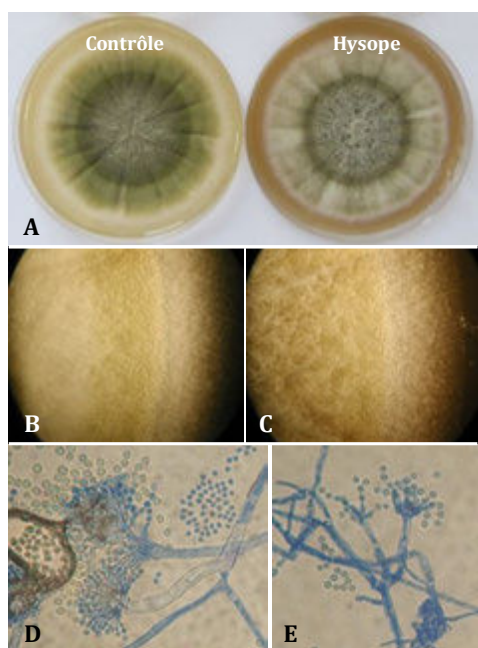


Figure 19. Altérations morphologiques observées chez la souche sensible d'*A. parasiticus* NCPT262 cultivées 8 jours à 27°C. **A.** Aspect macroscopique des colonies sur du MEA contrôle et supplémenté à 10 mg/ml d'hysope. **B.** Vue à la loupe binoculaire du mycélium périphérique de la culture contrôle sur MEA. **C.** Vue à la loupe binoculaire du mycélium périphérique de la culture de NCPT262 sur MEA + Hysope. **D** et **E.** Vues microscopiques (400x) des conidiophores sur MEA + hysope (photos S. Bailly).

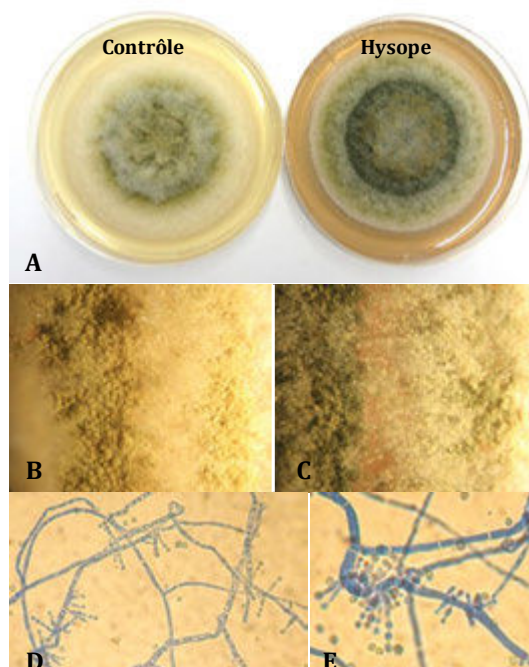


Figure 20. Altérations morphologiques observées chez la souche résistante d'*A. parasiticus* NCPT211 cultivées 8 jours à 27°C. **A.** Aspect macroscopique des colonies sur du MEA contrôle et supplémenté à 10 mg/ml d'hysope. **B.** Vue à la loupe binoculaire du mycélium périphérique de la culture contrôle sur MEA. **C.** Vue à la loupe binoculaire du mycélium périphérique de la culture de NCPT211 sur MEA + hysope. **D** et **E.** Vues microscopiques (400x) des conidiophores sur MEA + hysope (photos S. Bailly).

D. Conclusion

En conclusion, cette étude complémentaire a pu démontrer que l'extrait aqueux d'hysope inhibe la production d'aflatoxines chez *A. flavus* mais aussi chez d'autres espèces aflatoxinogènes de la section *Flavi*. Cet effet est observé sur toutes les aflatoxines, dans des proportions parfois variables en fonction des espèces.

L'analyse du mécanisme d'action de l'hysope réalisée sur la souche d'*A. flavus* E73 montre que l'inhibition de la synthèse d'aflatoxines est liée à une modulation négative de l'expression de tous les gènes du cluster. Cette modulation transcriptionnelle est elle-même en lien avec la modulation négative de l'expression des gènes codant le facteur de transcription interne au cluster, *aflR* et son co-activateur *aflS*.

L'expression de deux gènes, *veA* et *mtfA*, codant des facteurs de transcription (FT) globaux régulant le métabolisme primaire et secondaire, a été également modulée. Ces deux gènes interviennent dans la réponse du champignon au stress oxydatif, une voie qui semble être la clé de voute du mécanisme d'action anti-aflatoxinogène de l'extrait aqueux hysope comme en atteste la modulation de l'expression des gènes codant pour MsnA et SrrA ainsi que des gènes codant pour des enzymes de détoxification des ROS (*sod1*, *mnsod*, *catA* et *cat2*). L'analyse de l'expression de ces gènes chez une souche d'*A. parasiticus* résistante à l'effet de l'hysope a permis de confirmer l'implication de ces mécanismes dans l'inhibition de la synthèse d'AFB1 observée chez *A. flavus*.

L'effet anti-aflatoxinogène de l'extrait aqueux d'hysope est accompagné de modifications morphologiques. Cependant, il semble que ces modifications ne soient pas liées à l'inhibition de la production d'aflatoxines puisqu'elles sont toujours observées chez la souche résistante. L'extrait aqueux d'hysope est un extrait complexe, constitué de plusieurs composés et il est donc probable que les composés à l'origine des modifications morphologiques soient différents de ceux impliqués dans la modulation de la synthèse des aflatoxines. Il serait maintenant très intéressant de s'attacher à caractériser l'extrait aqueux d'hysope afin d'identifier le(s) composé(s) responsable(s) de l'effet anti-aflatoxine.

Conclusion générale et perspectives



Les objectifs principaux de ces travaux de thèse étaient de tester des extraits de plantes endémiques au Liban pour leur capacité à inhiber la production d'aflatoxines. En effet, cinquante cinq ans après sa découverte, la présence de l'aflatoxine B1 dans la chaîne alimentaire est toujours un sujet d'actualité et ce composé reste un contaminant majeur de par sa toxicité. Outre son importance dans les zones où le climat est classiquement favorable à la croissance des espèces toxigènes, les changements climatiques en cours font aussi craindre l'apparition de ces contaminants dans des zones jusque là indemnes.

Plusieurs stratégies de lutte ont été développées pour contrer le développement des souches aflatoxinogènes et, par la suite, la production d'aflatoxines. Ces méthodes sont surtout reposées sur une lutte chimique dont l'efficacité est de plus en plus limitée à cause : i) de la toxicité propre des produits utilisés, ii) du développement de résistance chez les souches fongiques ciblées et iii) de l'impact sur l'environnement lié à l'accumulation des produits chimiques dans l'eau et le sol et des effets associés sur les écosystèmes. Il semble donc nécessaire d'élaborer des stratégies alternatives plus écologiques, et efficaces à long terme pour lutter contre la production de l'aflatoxine B1.

De plus, la compréhension des mécanismes de régulation de la synthèse des aflatoxines à l'échelle moléculaire ainsi que des signaux environnementaux susceptibles de contrôler négativement la voie de biosynthèse de ces métabolites secondaires pourrait permettre de mieux cibler les composés d'intérêt, sur la base de relations structure-fonction ou de propriétés biologiques identifiées.

C'est dans cette optique que nos travaux se sont attachés à élaborer, sur la base des données bibliographiques disponibles, un outil moléculaire permettant l'analyse de l'expression des gènes directement et indirectement impliqués dans la régulation de la biosynthèse de l'aflatoxine B1 chez *A. flavus*.

Ensuite, nous nous sommes attachés à caractériser l'effet d'extraits naturels de plantes pour leur capacité à limiter la synthèse de l'aflatoxine B1 sans altérer la croissance fongique. Nous avons pu démontrer que les extraits aqueux de plantes avaient très souvent une activité équivalente voir supérieure aux huiles essentielles, traditionnellement plus

étudiées mais dont l'usage présente plusieurs limites, à commencer par leur toxicité et leur impact sur les qualités organoleptiques des produits traités. L'usage des extraits aqueux permettrait probablement de contourner ces difficultés. En effet, un éventuel effet toxique semble moins probable car les plantes testées ici sont très souvent ingérées après décoction ou infusion dans l'eau, sans toxicité associée. De plus, l'absence de composés aromatiques dans ces extraits permet d'éviter l'altération des propriétés organoleptiques des denrées traitées.

Ainsi, nous avons montré que plusieurs extraits aqueux de plantes méditerranéennes présentent des propriétés intéressantes dont l'extrait d'hysope, *Micromeria graeca*, qui a été caractérisé en détail dans cette étude.

Cependant ces extraits sont complexes et contiennent très certainement de nombreux composés différents. À l'heure actuelle, il n'y a que très peu de données sur la composition de tels extraits, ce qui limite la formulation d'hypothèses sur la nature des molécules actives responsables de l'effet anti-aflatoxinogène décrit dans notre travail. Il semble donc maintenant nécessaire de s'attacher à caractériser la composition de ces extraits afin d'identifier et d'isoler les molécules actives et vérifier leur absence de toxicité.

Par ailleurs, la nature hydrophile de ces molécules nécessitera certainement de mettre en place des procédures d'optimisation et de formulation afin de pouvoir les appliquer en stockage. En effet, pour éviter de réhumidifier des grains préalablement séchés, la technique de micro-encapsulation des composés actifs pourrait représenter une perspective intéressante à notre étude. Les microcapsules pourraient permettre le maintien de la stabilité des molécules actives et leur dispersion aisée dans la denrée traitée, le relargage du principe actif n'ayant lieu qu'en cas de réhumidification accidentelle pendant le stockage. La nature chimique du(es) principe(s) actif(s) identifié(s) sera un point clé dans le choix de la matière enrobante ainsi que dans la nature physico-chimique ou mécanique du procédé utilisé pour la micro-encapsulation (gélification, coacervation, atomisation, technique reposant sur CO₂ supercritique, etc) (Nesterenko, 2012).

Bien entendu, il conviendra aussi de vérifier que les molécules actives soient toujours capables de bloquer la production des toxines dans les conditions réelles de stockage, sur des grains, dans des conditions hydro-thermiques compatibles avec celles observées en cours du stockage.

A

- Abbas, H.K., Weaver, M. a., Horn, B.W., Carbone, I., Monacell, J.T. & Shier, W.T. (2011) Selection of *Aspergillus flavus* isolates for biological control of aflatoxins in corn. Toxin Reviews, 30, 59–70.
- Abbas, H.K., Wilkinson, J., Zablutowicz, R., Accinelli, C., Abel, C.A., Bruns, H. & Weaver, M. (2009) Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. Toxin Reviews, 28, 142–153.
- Abbas, H.K., Zablutowicz, R.M., Bruns, H.A. & Abel, C.A. (2006) Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. Biocontrol Science and Technology, 16, 437–449.
- Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A.R. & Abbaszadeh, A. (2014) Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. Journal de mycologie médicale, 24, e51–6.
- Abd El-Aziz, A.R.M., Mahmoud, M.A., Al-Othman, M.R. & Al-Gahtani, M.F. (2015) Use of selected essential oils to control aflatoxin contaminated stored cashew and detection of aflatoxin biosynthesis gene. Scientific World Journal, Volume 2015, Article ID 958192, 13 pages.
- Abdel-Hadi, A.M., Caley, D.P., Carter, D.R.F. & Magan, N. (2011) Control of aflatoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* using RNA silencing technology by targeting *aflD* (*nor-1*) gene. Toxins, 3, 647–59.
- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S. & Rezaie, A. (2004) Pesticides and oxidative stress: a review. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research, 10, RA141–A147.
- Adams, T.H., Hide, W.A., Yager, L.N. & Lee, B.N. (1992) Isolation of a gene required for programmed initiation of development by *Aspergillus nidulans*. Molecular and cellular biology, 12, 3827–33.
- Affeldt, K., Carrig, J., Amare, M.G. & Keller, N. (2014) Global Survey of Canonical *Aspergillus flavus* G Protein-Coupled Receptors. mBio, 5, 1501–14.
- Affeldt, K.J., Brodhagen, M. & Keller, N.P. (2012) *Aspergillus* oxylipin signaling and quorum sensing pathways depend on G protein-coupled receptors. Toxins, 4, 695–717.
- AFSSA (2009) Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale Rapport final.
- Ahlberg, S.H., Joutsjoki, V. & Korhonen, H.J. (2015) Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. International Journal of Food Microbiology, 207, 87–102.
- Alakonya, A. & Monda, E. (2013) A New Approach in Aflatoxin Management in Africa: Targeting Aflatoxin / Sterigmatocystin Biosynthesis in *Aspergillus* Species by RNA Silencing Technique. In *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*, chapter 3, pp 41–57.

- Alassane-Kpembi, I., Schatzmayr, G., Taranu, I., Marin, D., Puel, O. & Oswald, I.P. (2016) Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. DOI: 10.1080/10408398.2016.1140632
- Alonso, V.A., Pereyra, C.M., Keller, L.A.M., Dalcerro, A.M., Rosa, C.A.R., Chiacchiera, S.M. & Cavaglieri, L.R. (2013) Fungi and mycotoxins in silage: An overview. Journal of Applied Microbiology, 115, 637–643.
- Amaiike, S., Affeldt, K.J., Yin, W.-B., Franke, S., Choithani, A. & Keller, N.P. (2013) The bZIP protein MeaB mediates virulence attributes in *Aspergillus flavus*. PloS one, 8, e74030.
- Amaiike, S. & Keller, N.P. (2011) *Aspergillus flavus*. Annual review of phytopathology, 49, 107–33.
- 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.
- Atanda, O.O., Akpan, I. & Oluwafemi, F. (2007) The potential of some spice essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. Food Control, 18, 601–607.
- Atehnkeng, J., Ojiambo, P.S., Ikotun, T., Sikora, R. a, Cotty, P.J. & Bandyopadhyay, R. (2008) Evaluation of atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents for aflatoxin in maize. Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment, 25, 1264–1271.

B

- Baidya, S., Duran, R.M., Lohmar, J.M., Harris-Coward, P.Y., Cary, J.W., Hong, S.-Y., Roze, L. V., Linz, J.E. & Calvo, A.M. (2014) VeA is associated with the response to oxidative stress in the aflatoxin producer *Aspergillus flavus*. Eukaryotic cell, 13, 1095–103.
- Bailly, J.-D. & Guerre, P. (2009) Mycotoxin analysis in muscle. Safety of Meat and Processed Meat, 83–124.
- Bandyopadhyay, R., Atehnkeng, J., Adebawale, A., Lawrence, K., Mutegi, C., Senghor, L. & Cotty, P.J. (2015) Developing Measurement Approaches and Intervention Strategies for Smallholders. In *The First International Congress on Postharvest Loss Prevention* Rome, Italy.
- Baranyi, N., Kocsubé, S., Vágvolgyi, C. & Varga, J. (2013) Current trends in aflatoxin research. Acta Biologica Szegediensis, 57, 95–107.
- Barrett-Bee, K. & Dixon, G. (1995) Ergosterol biosynthesis inhibition: a target for antifungal agents. Acta biochimica Polonica, 42, 465–479.
- 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, 94, 38–46.

- Bayram, O. & Braus, G.H. (2012) Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. FEMS microbiology reviews, 36, 1–24.
- 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*, chapter 12, pp 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
- Bennett, J.W. & Klich, M. (2003) Mycotoxins. Clinical microbiology reviews, 16, 497–516.
- Bethke, N.W., Conrad, C.A., Costanian, M.K., Fosdick, L.E., Grunig, D., Kirkvold, S.W., LAdhe, A.R., Lewis, M.J., Peters, E.M., Schanilec, A.J., Smith, R.N., Sumner, E., Yang, P., Yehia, H.N. & Zullo, J.L. (2015), Patent, US 2015/0090642 A1.
- 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.
- BIOMIN GmbH (2014) Mycotoxin Survey 2014.
- Blair, D. (1989) Uncertainties in Pesticide Risk Estimation and Consumer Concern. Nutrition Today, 13–19.
- Bluma, R., Amaiden, M.R., Daghero, J. & Etcheverry, M. (2008) Control of *Aspergillus* section *Flavi* growth and aflatoxin accumulation by plant essential oils. Journal of applied microbiology, 105, 203–14.
- Borgemeister, C., Adda, C., Sétamou, M., Hell, K., Djomamou, B., Markham, R.H. & Cardwell, K.F. (1998) Timing of harvest in maize: Effects on post harvest losses due to insects and fungi in central Benin, with particular reference to *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae). Agriculture, Ecosystems and Environment, 69, 233–242.
- Brent, K.J. & Hollomon, D.W. (2007) Fungicide resistance: the assessment of the risk. Fungicide Resistance Action Committee, FRAC Monograph, 53.
- Brown, M.P., Brown-Jenco, C.S. & Payne, G. A. (1999) Genetic and molecular analysis of aflatoxin biosynthesis. Fungal genetics and biology : FG & B, 26, 81–98.
- Brown, R.L., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E. & Chen, Z. (2013) Development of Maize Host Resistance to Aflatoxigenic Fungi. In *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*, chapter 1, pp 3–22.

- Brown, R.L., Chen, Z.Y., Warburton, M., Luo, M., Menkir, A., Fakhoury, A. & Bhatnagar, D. (2010) Discovery and characterization of proteins associated with aflatoxin-resistance: Evaluating their potential as breeding markers. Toxins, 2, 919–933.
- Brown, S.H. & Scott, J.B. (2009) Oxygenase coordination is required for morphological transition and the host-fungus interaction of *Aspergillus flavus*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 22, 882–894.
- Bruynzeel, D.P. & Van Ketel, W.G. (1986) Contact dermatitis due to chlorothalonil in floriculture. Contact Dermatitis, 14, 67–68.
- Bullerman, L.B. & Bianchini, A. (2007) Stability of mycotoxins during food processing. International Journal of Food Microbiology, 119, 140–146.

C

- CAC (2004) Code of practice for the prevention and reduction of aflatoxin contamination in tree nuts. , 1–14.
- Cai, J., Zeng, H., Shima, Y., Hatabayashi, H., Nakagawa, H., Ito, Y., Adachi, Y., Nakajima, H. & Yabe, K. (2008) Involvement of the *nadA* gene in formation of G-group aflatoxins in *Aspergillus parasiticus*. Fungal Genetics and Biology: FG & B, 45, 1081–93.
- Calvo, A.M. (2008) The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. Fungal Genetics and Biology: FG & B, 45, 1053–61.
- Calvo, A.M. & Bok, J. (2004) *veA* is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. Applied and Environmental Microbiology, 70, 4733–4739.
- Cano-Sancho, G., Sanchis, V., Marin, S. & Ramos, A.J. (2013) Occurrence and exposure assessment of aflatoxins in Catalonia (Spain). Food and Chemical Toxicology, 51, 188–193.
- Cary, J.W., Harris-Coward, P.Y., Ehrlich, K.C., Mack, B.M., Kale, S.P., Larey, C. & Calvo, A.M. (2012) NsdC and NsdD affect *Aspergillus flavus* morphogenesis and aflatoxin production. Eukaryotic cell, 11, 1104–11.
- Cary, J.W., Rajasekaran, K., Brown, R.L., Luo, M., Chen, Z., Bhatnagar, D., Regional, S., Orleans, N., Physiology, C. & Rouge, B. (2011) Developing Resistance to Aflatoxin in Maize and Cottonseed. , 678–696.
- CAST (2003) Council for Agricultural Science and Technology - Task force report.
- Chanda, A., Roze, L. V & Linz, J.E. (2010) A possible role for exocytosis in aflatoxin export in *Aspergillus parasiticus*. Eukaryotic Cell, 9, 1724–1727.
- Chanda, A., Roze, L. V, Pastor, A., Frame, M.K. & Linz, J.E. (2009a) Purification of a vesicle-vacuole fraction functionally linked to aflatoxin synthesis in *Aspergillus parasiticus*. Journal of Microbiological Methods, 78, 28–33.

- Chanda, A., Roze, L. V., Kang, S., Artymovich, K.A., Hicks, G.R., Raikhel, N. V., Calvo, A.M. & Linz, J.E. (2009b) A key role for vesicles in fungal secondary metabolism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106, 19533–19538.
- Chang, P.-K., Ehrlich, K.C., Yu, J., Bhatnagar, D. & Cleveland, T.E. (1995) Increased expression of *Aspergillus parasiticus aflR*, encoding a sequence-specific DNA-binding protein, relieves nitrate inhibition of aflatoxin biosynthesis. Applied and Environmental Microbiology, 61, 2372–2377.
- Chang, P.-K., Yu, J., Bhatnagar, D. & Cleveland, T.E. (2000) Characterization of the *Aspergillus parasiticus* major nitrogen regulatory gene, *areA*. Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression, 1491, 263–266.
- Chang, P.-K. (2003) The *Aspergillus parasiticus* protein AFLJ interacts with the aflatoxin pathway-specific regulator AFLR. Molecular genetics and genomics: MGG, 268, 711–719.
- Chang, P.-K., Yu, J. & Yu, J.-H. (2004) *aflT*, a MFS transporter-encoding gene located in the aflatoxin gene cluster, does not have a significant role in aflatoxin secretion. Fungal genetics and biology: FG & B, 41, 911–20.
- Chang, P.-K., Horn, B.W. & Dorner, J.W. (2005) Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. Fungal genetics and biology: FG & B, 42, 914–23.
- Chang, P.-K., Matsushima, K., Takahashi, T., Yu, J., Abe, K., Bhatnagar, D., Yuan, G.F., Koyama, Y. & Cleveland, T.E. (2007) Understanding nonaflatoxigenicity of *Aspergillus sojae*: A windfall of aflatoxin biosynthesis research. Applied Microbiology and Biotechnology, 76, 977–984.
- Chang, P.-K., Scharfenstein, L.L.L., Luo, M., Mahoney, N., Molyneux, R.J., Yu, J., Brown, R.L. & Campbell, B.C. (2011) Loss of *msnA*, a Putative Stress Regulatory Gene, in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* Increased Production of Conidia, Aflatoxins and Kojic Acid. Toxins, 3, 82–104.
- Chang, P.-K., Abbas, H.K., Weaver, M.A., Ehrlich, K.C., Scharfenstein, L.L. & Cotty, P.J. (2012a) Identification of genetic defects in the atoxigenic biocontrol strain *Aspergillus flavus* K49 reveals the presence of a competitive recombinant group in field populations. International Journal of Food Microbiology, 154, 192–196.
- Chang, P.-K., Scharfenstein, L.L., Ehrlich, K.C., Wei, Q., Bhatnagar, D., Ingber, B.F. & Harris, S. (2012b) Effects of *laeA* deletion on *Aspergillus flavus* conidial development and hydrophobicity may contribute to loss of aflatoxin production. Fungal Biology, 116, 298–307.
- Chang, P.-K., Scharfenstein, L.L., Mack, B. & Ehrlich, K.C. (2012c) Deletion of the *Aspergillus flavus* orthologue of *A. nidulans fluG* reduces conidiation and promotes production of sclerotia but does not abolish aflatoxin biosynthesis. Applied and environmental microbiology, 78, 7557–63.

- Chang, P.-K., Scharfenstein, L.L., Li, P. & Ehrlich, K.C. (2013) *Aspergillus flavus* VelB acts distinctly from VeA in conidiation and may coordinate with FluG to modulate sclerotial production. Fungal genetics and biology : FG & B, 58-59, 71–9.
- Chen, R., Ma, F., Li, P.W., Zhang, W., Ding, X.X., Zhang, Q., Li, M., Wang, Y.R. & Xu, B.C. (2014) Effect of ozone on aflatoxins detoxification and nutritional quality of peanuts. Food Chemistry, 146, 284–288.
- Chen, Y.-S., Yanagida, F. & Shinohara, T. (2005) Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. Letters in Applied Microbiology, 40, 195–200.
- Chen, Z.Y., Brown, R.L., Russin, J.S., Lax, a R. & Cleveland, T.E. (1999) A Corn Trypsin Inhibitor with Antifungal Activity Inhibits *Aspergillus flavus* alpha-Amylase. Phytopathology, 89, 902–907.
- Chiang, Y.M., Szewczyk, E., Davidson, A.D., Entwistle, R., Keller, N.P., Wang, C.C.C. & Oakley, B.R. (2010) Characterization of the *Aspergillus nidulans* monodictyphenone gene cluster. Applied and Environmental Microbiology, 76, 2067–2074.
- Chin, B.H., McGloin, J.B., Spangler, N.L. & Heilman, R.D. (1981) Chlorothalonil equivalents in the blood and urine of rats following oral, endotracheal, and dermal administration of 14C-chlorothalonil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 26, 258–261.
- Chizzola, R. (2013) Chapter 96 - Regular Monoterpenes and Sesquiterpenes (Essential Oils). In *Natural Products* p 2973.
- Chulze, S.N. (2010) Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review. Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment, 27, 651–657.
- Cotty, P.J. (1990) Effect of Atoxigenic strains of *Aspergillus flavus* on Aflatoxin contamination of developing cottonseed. Plant Disease, 74, 233–235.
- Crawford, J.M., Thomas, P.M., Scheerer, J.R., Vagstad, A.L., Kelleher, N.L. & Townsend, C.A. (2008) Deconstruction of Iterative Multidomain Polyketide Synthase Function. Science, 320, 243–246.
- Cui, A., Hua, H., Shao, T., Song, P., Kong, Q., Luo, T. & Jiang, Y. (2015) Aflatoxin B1 induces Src phosphorylation and stimulates lung cancer cell migration. Tumor Biology, 1–7.

D

- D’Mello, J.P.F. & Macdonald, A.M.C. (1997) Mycotoxins. Animal Feed Science Technology, 69, 155–166.
- D’Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., Postel, D., Dijksma, W.T.P., Dujardin, A. & Placinta, C.M. (1998) Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. European Journal of Plant Pathology, 104, 741–751.

- Dakovic, A., Kragovic, M., Rottinghaus, G.E., Ledoux, D.R., Butkeraitis, P., Vojislavljevic, D.Z., Zaric, S.D. & Stamenic, L. (2012) Preparation and characterization of zinc-exchanged montmorillonite and its effectiveness as aflatoxin B1 adsorbent. Materials Chemistry and Physics, 137, 213–220.
- Dalié, D.K.D., Deschamps, a. M. & Richard-Forget, F. (2010) Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. Food Control, 21, 370–380.
- Dayan, F.E., Cantrell, C.L. & Duke, S.O. (2009) Natural products in crop protection. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 17, 4022–4034.
- 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.
- Diao, E., Dong, H., Hou, H., Zhang, Z., Ji, N. & Ma, W. (2015) Factors Influencing Aflatoxin Contamination in Before and After Harvest Peanuts: A Review. Journal of Food Research, 4, 148–154.
- Dorner, J. & Lamb, M.C. (2006) Development and commercial use of afla-Guard | an aflatoxin biocontrol agent *Aspergillus flavus*. Mycotoxin Research, 22, 33–38.
- Dorner, J.W. (2008) Management and prevention of mycotoxins in peanuts. Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment, 25, 203–208.
- Dorner, J.W. (2009) Biological control of aflatoxin contamination in corn using a nontoxigenic strain of *Aspergillus flavus*. Journal of food protection, 72, 801–804.
- Dorner, J.W. & Cole, R.J. (2002) Effect of application of nontoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on subsequent aflatoxin contamination of peanuts in storage. Journal of Stored Products Research, 38, 329–339.
- Dorner, J.W., Cole, R.J., Sanders, T.H. & Blankenship, P.D. (1989) Interrelationship of kernel water activity, soil temperature, maturity, and phytoalexin production in preharvest aflatoxin contamination of drought-stressed peanuts. Mycopathologia, 105, 117–128.
- Duran, R.M., Cary, J.W. & Calvo, A.M. (2007) Production of cyclopiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by *veA*, a gene necessary for sclerotial formation. Applied microbiology and biotechnology, 73, 1158–68.

E

- Egner, P. A, Wang, J.B., Zhu, Y.R., Zhang, B.C., Wu, Y., Zhang, Q.N., Qian, G.S., Kuang, S.Y., Gange, S.J., Jacobson, L.P., Helzlsouer, K.J., Bailey, G.S., Groopman, J.D. & Kensler, T.W. (2001) Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98, 14601–14606.

- Ehrlich, K.C., Montalbano, B.G. & Cary, J.W. (1999b) Binding of the C6-zinc cluster protein, AFLR, to the promoters of aflatoxin pathway biosynthesis genes in *Aspergillus parasiticus*. Gene, 230, 249–257.
- Ehrlich, K.C., Cary, J.W. & Montalbano, B.G. (1999a) Characterization of the promoter for the gene encoding the aflatoxin biosynthetic pathway regulatory protein AFLR. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, 1444, 412–417.
- Ehrlich, K.C., Montalbano, B.G., Cary, J.W. & Cotty, P.J. (2002) Promoter elements in the aflatoxin pathway polyketide synthase gene. Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression, 1576, 171–175.
- Ehrlich, K., Montalbano, B. & Cotty, P. (2003) Sequence comparison of aflR from different *Aspergillus* species provides evidence for variability in regulation of aflatoxin production. Fungal Genetics and Biology, 38, 63–74.
- Ehrlich, K.C., Chang, P., Yu, J. & Cotty, P.J. (2004) Aflatoxin Biosynthesis Cluster Gene *cypA* Is Required for G Aflatoxin Formation. Applied and environmental microbiology, 70, 6518–6524.
- Ehrlich, K.C. & Cotty, P.J. (2004) An isolate of *Aspergillus flavus* used to reduce aflatoxin contamination in cottonseed has a defective polyketide synthase gene. Applied Microbiology and Biotechnology, 65, 473–478.
- Ehrlich, K. (2007) Aflatoxin biosynthesis and regulation.
- Ehrlich, K.C. (2009) Predicted roles of the uncharacterized clustered genes in aflatoxin biosynthesis. Toxins, 1, 37–58.
- Ehrlich, K.C. (2014) Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* to prevent aflatoxin contamination in crops: advantages and limitations. Frontiers in microbiology, 5, 50.
- Elzupir, A.O., Abas, A.R. a, Fadul, M.H., Modwi, A.K., Ali, N.M.I., Jadian, A.F.F., Ahmed, N.A. a, Adam, S.Y. a, Ahmed, N. a M., Khairy, A. a & Khalil, E. a G. (2012) Aflatoxin M1 in breast milk of nursing Sudanese mothers. Mycotoxin research, 28, 131–4 Available at:
- Enwonwu, C. (1984) the Role of Dietary Aflatoxin in the Genesis of Hepatocellular Cancer in Developing Countries. The Lancet, 324, 956–958.
- European Commission (2009) Commission regulation No. 386/ 2009 of 12 May 2009 a of the European Parliament and of the Council as regards the establishment of a new functional group of feed additives.

F

FAO/WHO (1999) 49th JECFA Meeting. Evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva.

- FAO (2004) Mycotoxin regulations in 2003 and current developments. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003, 9–28.
- Ferreira, F.D., Kimmelmeier, C., Arrotéia, C.C., da Costa, C.L., Mallmann, C.A., Janeiro, V., Ferreira, F.M.D., Mossini, S.A.G., Silva, E.L. & Machinski, M. (2013) Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. Food chemistry, 136, 789–93
- Flaherty, J.E. & Payne, G. a (1997) Overexpression of aflR Leads to Upregulation of Pathway Gene Transcription and Increased Aflatoxin Production in *Aspergillus flavus*. Applied and environmental microbiology, 63, 3995–4000
- Food and Drug Administration (2013) US Code of Federal Regulations Title 21, Part 182, Section 182.20, 129–130.
- Food and Drug Administration (2016) Guidance for Industry - Ensuring Safety of Animal Feed Maintained and Fed On-Farm #203.
- Fox, E.M. & Howlett, B.J. (2008) Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. Current opinion in microbiology, 11, 481–7.

G

- Gallo, A. & Masoero, F. (2010) *In vitro* models to evaluate the capacity of different sequestering agents to adsorb aflatoxins. Italian Journal of Animal Science, 9, 109–116.
- Gibson, a M., Baranyi, J., Pitt, J.I., Eyles, M.J. & Roberts, T. a (1994) Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. International journal of food microbiology, 23, 419–431.
- Gilbert, M.K., Mack, B.M., Wei, Q., Bland, J.M., Bhatnagar, D. & Cary, J.W. (2016) RNA sequencing of an nsdC mutant reveals global regulation of secondary metabolic gene clusters in *Aspergillus flavus*. Microbiological Research, 182, 150–61.
- Gocmen, A., Peters, H.A., Cripps, D.J., Bryan, G.T. & Morris, C.R. (1989) Hexachlorobenzene episode in Turkey. Biomedical and environmental sciences: BES, 2, 36–43.
- Gocmen, A., Peters, H.A., Cripps, D.J., Morris, C.R. & Dogramaci, I. (1986) *Porphyria turcica*: hexachlorobenzene-induced porphyria. IARC scientific publications, 567–73.
- Gong, Y.Y., Egal, S., Hounsa, A., Turner, P.C., Hall, A.J., Cardwell, K.F. & Wild, C.P. (2003) Determinants of aflatoxin exposure in young children from Benin and Togo, West Africa: The critical role of weaning. International Journal of Epidemiology, 32, 556–562.
- Di Gregorio, M.C., Neeff, D.V. de, Jager, A.V., Corassin, C.H., Carão, Á.C. de P., Albuquerque, R. de, Azevedo, A.C. de & Oliveira, C.A.F. (2014) Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. Toxin Rev., 33, 125–135.

G

- Grenier, B. (2011) Effets chez le porcelet d'une exposition à un régime co-contaminé en mycotoxines, et appréciation des stratégies de lutte, Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Grenier, B., Loureiro-Bracarense, A.-P., Leslie, J.F. & Oswald, I.P. (2009) Physical and chemical methods for mycotoxin decontamination in maize. In *Mycotoxin Reduction in Grain Chains* p 376. John Wiley & Sons.
- Grintzalis, K., Vernardis, S.I., Klapa, M.I. & Georgiou, C.D. (2014) Role of oxidative stress in sclerotial differentiation and aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus flavus*. Applied and Environmental Microbiology, 80, 5561–5571.
- Guo, B.Z., Chen, Z.Y., Brown, R.L., Lax, a R., Cleveland, T.E., Russin, J.S., Mehta, a D., Selitrennikoff, C.P. & Widstrom, N.W. (1997) Germination induces accumulation of specific proteins and antifungal activities in corn kernels. Phytopathology, 87, 1174–1178.

H

- Hameed, H.G. (1993) Extrusion and chemical treatments for destruction of aflatoxin in naturally-contaminated corn. Thèse de Doctorat, The University of Arizona.
- 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.
- Hartnoll, G., Moore, D. & Douek, D. (1993) Near fatal ingestion of oil of cloves. Archives of disease in childhood, 69, 392–393.
- Hasan, H. a (1999) Mode of action of pesticides on aflatoxin biosynthesis and oxidase system activity. Microbiological research, 154, 95–102.
- Hassan, H.F. & Kassaify, Z. (2014) The risks associated with aflatoxins M1 occurrence in Lebanese dairy products. Food Control, 37, 68–72.
- He, Z.-M.M., Price, M.S., Obrian, G.R., Georgianna, D.R. & Payne, G.A. (2007) Improved protocols for functional analysis in the pathogenic fungus *Aspergillus flavus*. BMC Microbiol, 7, 104.
- Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P. & Denning, D.W. (2007) *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. Microbiology, 153, 1677–1692.
- Hell, K., Fandohan, P., Bandyopadhyay, R., Kiewnick, S., Sikora, R. & Cotty, P.J. (2008) Pre- and postharvest management of aflatoxin in maize: An African perspective. Mycotoxins: Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade, 209–218.

- Hell, K. & Mutegi, C. (2011) Aflatoxin control and prevention strategies in key crops of Sub-Saharan Africa. African Journal of Microbiology Research, 5, 459–466.
- Herzallah, S., Alshwabkeh, K. & Al Fataftah, A. (2008) Aflatoxin decontamination of artificially contaminated feeds by sunlight, γ -radiation, and microwave heating. Journal of Applied Poultry Research, 17, 515–521.
- Herzallah, S.M. (2009) Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. Food Chemistry, 114, 1141–1146.
- Herzallah, S.M. (2013) Aflatoxin B1 residues in eggs and flesh of laying hens fed aflatoxin B1 contaminated diet. American Journal of Agricultural and Biological Science, 8, 156–161.
- Hicks, J.K., Yu, J.H., Keller, N.P. & Adams, T.H. (1997) *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G α protein-dependent signaling pathway. The EMBO journal, 16, 4916–4923.
- Hong, S.-Y., Roze, L. V. & Linz, J.E. (2013a) Oxidative Stress-Related Transcription Factors in the Regulation of Secondary Metabolism. Toxins, 5, 683–702.
- Hong, S.-Y., Roze, L. V., Wee, J. & Linz, J.E. (2013b) Evidence that a transcription factor regulatory network coordinates oxidative stress response and secondary metabolism in aspergilli. MicrobiologyOpen, 2, 144–60.
- Howes, D.A. & Newman, K.E. (2000) Compositions and methods for removal of mycotoxins from animal feed. Patent, US006045834A.
- Huang, Z., White, D.G. & Payne, G. a (1997) Corn Seed Proteins Inhibitory to *Aspergillus flavus* and Aflatoxin Biosynthesis. Phytopathology, 87, 622–627.
- Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O. & Dutler, H. (2001) Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. Toxicology Letters, 122, 179–188.
- Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J.L., Barbier, G. & Coton, E. (2014) Filamentous fungi and mycotoxins in Cheese: A review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 13, 437–456.

I

- IARC Monograph (1993) Aflatoxins. International Agency for Research on Cancer, 56.
- IARC Monograph (2002) Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, International Agency for Research on Cancer, 82.
- Ibáñez-Vea, M., González-Peñas, E., Lizarraga, E. & López De Cerain, A. (2012) Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in barley from a northern region of Spain. Food Chemistry,

132, 35–42.

Iqbal, S.Z. & Asi, M.R. (2013) Assessment of aflatoxin M1 in milk and milk products from Punjab, Pakistan. Food Control, 30, 235–239.

Isman, M.B. (2000) Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection, 19, 603–608.

Isman, M.B. & Machial, C.M. (2006) Chapter 2 Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. Advances in Phytomedicine, 3, 29–44.

J

Jane, C., Kiprop, E.K. & Mwamburi, L.A. (2014) Biocontrol of Aflatoxins in Corn using Atoxigenic *Aspergillus flavus*: Review. International Journal of Science and Research, 3, 1954–1958.

Jarvis, B.B. & Miller, J.D. (2005) Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. Applied Microbiology and Biotechnology, 66, 367–372.

Jayashree, T. & Subramanyam, C. (1999) Antiaflatoxigenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. Letters in Applied Microbiology, 28, 179–83.

Jayashree, T. & Subramanyam, C. (2000) Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Free Radical Biology and Medicine, 29, 981–985.

Jaynes, W.F. & Zartman, R.E. (2011) Aflatoxin toxicity reduction in feed by enhanced binding to surface-modified clay additives. Toxins, 3, 551–65.

Jiang, Y., Jolly, P.E., Preko, P., Wang, J.-S., Ellis, W.O., Phillips, T.D. & Williams, J.H. (2008) Aflatoxin-related immune dysfunction in health and in human immunodeficiency virus disease. Clinical & developmental immunology, 2008, 790309.

Jouany, J.P., Yiannikouris, A. & Bertin, G. (2009) Risk assessment of mycotoxins in ruminants and ruminant products. Options Méditerranéennes. Série A, 224, 205–224.

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.

Juodeikiene, G., Basinskiene, L., Bartkiene, E. & Matusевичius, P. (2012) Mycotoxin Decontamination Aspects in Food, Feed and Renewables Using Fermentation Processes. In Structure and Function of Food Engineering pp 171–204.

K

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

- Kara, G.N., Ozbey, F. & Kabak, B. (2015) Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in cereal flours commercialised in Turkey. *Food Control*, 54, 275–281.
- Kato, N., Brooks, W. & Calvo, A.M. (2003) The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. *Eukaryotic Cell*, 2, 1178–1186.
- Kedia, A., Prakash, B., Mishra, P.K., Chanotiya, C.S. & Dubey, N.K. (2014a) Antifungal, antiaflatoxic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 89, 29–36.
- Kedia, A., Prakash, B., Mishra, P.K. & Dubey, N.K. (2014b) Antifungal and antiaflatoxic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. *International Journal of Food Microbiology*, 168–169, 1–7.
- Kedia, A., Jha, D.K. & Dubey, N.K. (2015) Plant essential oils as natural fungicides against stored product fungi. In *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs* pp 208–214.
- Kedia, A., Dwivedy, A.K., Jha, D.K. & Dubey, N.K. (2016) Efficacy of *Mentha spicata* essential oil in suppression of *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in chickpea with particular emphasis to mode of antifungal action. *Protoplasma*, 253, 647–653.
- Keller, N.P., Turner, G. & Bennett, J.W. (2005) Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 937–947.
- Khan, T., Shahid, A.A. & Khan, H.A.A. (2016) Could biorational insecticides be used in the management of aflatoxic *Aspergillus parasiticus* and its insect vectors in stored wheat? *PeerJ*, 4, e1665.
- El Khoury, A. & Atoui, A. (2010) Ochratoxin a: general overview and actual molecular status. *Toxins*, 2, 461–93.
- El Khoury, A., Atoui, A., Rizk, T., Lteif, R., Kallassy, M. & Lebrihi, A. (2011) Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from pure culture and aflatoxin-contaminated grapes using PCR-RFLP analysis of *aflR-aflJ* intergenic spacer. *Journal of food science*, 76, 247–253.
- Kim, H., Han, K., Kim, K., Han, D., Jahng, K. & Chae, K. (2002) The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 37, 72–80.
- Kim, J.H., Campbell, B.C., Mahoney, N.E., Chan, K.L. & Molyneux, R.J. (2004) Identification of phenolics for control of *Aspergillus flavus* using *Saccharomyces cerevisiae* in a model target-gene bioassay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 7814–7821.
- Kim, J.H., Mahoney, N., Chan, K.L., Molyneux, R.J. & Campbell, B.C. (2006) Controlling food-contaminating fungi by targeting their antioxidative stress-response system with natural phenolic

- compounds. Applied Microbiology and Biotechnology, 70, 735–739.
- Kimura, N. & Hirano, S. (1988) Inhibitory Strains of *Bacillus subtilis* for Growth and Aflatoxin production of Aflatoxigenic Fungi. Agricultural and Biological Chemistry, 52, 1173–1179.
- Klich, M. A. & Pitt, J.I. (1988) Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. Transactions of the British Mycological Society, 91, 99–108.
- Klich, M. A., Lax, A.R., Bland, J.M. & Scharfenstein, L.L. (1993) Influence of Iturin-a on Mycelial Weight and Aflatoxin Production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in Shake Culture. Mycopathologia, 123, 35–38.
- Klich, M.A. (2007) *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. Molecular plant pathology, 8, 713–722.
- Klich, M. A. (2009) Health effects of *Aspergillus* in food and air. Toxicology and industrial health, 25, 657–667.
- Kong, Q., Chi, C., Yu, J., Shan, S., Li, Q., Li, Q., Guan, B., Nierman, W.C. & Bennett, J.W. (2014) The inhibitory effect of *Bacillus megaterium* on aflatoxin and cyclopiazonic acid biosynthetic pathway gene expression in *Aspergillus flavus*. Applied Microbial and Cell Physiology, 98, 5161–72.
- Kong, Q., Shan, S., Liu, Q., Wang, X. & Yu, F. (2010) Biocontrol of *Aspergillus flavus* on peanut kernels by use of a strain of marine *Bacillus megaterium*. International Journal of Food Microbiology, 139, 31–35.
- Kornsakulkarn, J., Saepua, S., Srichomthong, K., Supothina, S. & Thongpanchang, C. (2012) New mycotoxins from the scale insect fungus *Aschersonia coffeae* Henn. BCC 28712. Tetrahedron, 68, 8480–8486.
- Kornsakulkarn, J., Saepua, S., Laksanacharoen, P., Rachtawee, P. & Thongpanchang, C. (2013) Xanthone and anthraquinone-type mycotoxins from the scale insect fungus *Aschersonia marginata* BCC 28721. Tetrahedron Letters, 54, 3813–3815.
- 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.
- Kos, J., Lević, J., Duragić, O., Kokić, B. & Miladinović, I. (2014) Occurrence and estimation of aflatoxin M1 exposure in milk in Serbia. Food Control, 38, 41–46.
- Krishnan, S., Manavathu, E.K. & Chandrasekar, P.H. (2009) *Aspergillus flavus*: An emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. Mycoses, 52, 206–222.
- 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.
- Kumar, A., Shukla, R., Singh, P., Prasad, C.S. & Dubey, N.K. (2008) Assessment of *Thymus vulgaris* L.

essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 9, 575–580.

Kumar, A., Shukla, R., Singh, P. & Dubey, N.K. (2010) Chemical composition, antifungal and antiaflatoxic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. Food and Chemical Toxicology, 48, 539–543.

L

Lamboni, Y. & Hell, K. (2009) Propagation of mycotoxigenic fungi in maize stores by post-harvest insects. International Journal of Tropical Insect Science, 29, 31–39.

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.

Larsen, Anders, I., Larsen, A., Jepsen, J.R. & Jorgensen, R. (1990) Contact allergy to the fungicide benomyl? Contact Dermatitis, 22, 278–281.

Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Lubber, G., Kieszak, S., Nyamongo, J., Backer, L., Dahiye, A., Misore, A., DeCock, K. & Rubin, C. (2005) Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicoses in Eastern and Central Kenya. Environmental Health Perspectives, 113, 1763–1767.

Lind, A.L., Wisecaver, J.H., Smith, T.D., Feng, X., Calvo, A.M. & Rokas, A. (2015) Examining the Evolution of the Regulatory Circuit Controlling Secondary Metabolism and Development in the Fungal Genus *Aspergillus*. PLOS Genetics, 11, e1005096.

Linz, J.E., Wee, J. & Roze, L. V (2014) *Aspergillus parasiticus* *SU-1* Genome Sequence, Predicted Chromosome Structure, and Comparative Gene Expression under Aflatoxin-Inducing Conditions: Evidence that Differential Expression Contributes to Species Phenotype. Eukaryotic cell, 13, 1113–23.

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.

Lyn, M.E., Abbas, H.K., Zablotowicz, R.M. & Johnson, B.J. (2009) Delivery systems for biological control agents to manage aflatoxin contamination of pre-harvest maize. Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment, 26, 381–387.

M

Magan, N., Medina, A. & Aldred, D. (2011) Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. Plant Pathology, 60, 150–163.

Mahendra, R. & Kovics, G. (2010) Progress in Mycology.

- EL Mahgubi, A., Bailly, S., Tadriss, S., Querin, A., Ouadia, A., Oswald, I.P. & Bailly, J.-D. (2013) Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in spices marketed in Morocco. Food Control, 32, 143–148.
- Marechera, G. (2015) Estimation of the potential adoption of Aflasafe among smallholder maize farmers in lower eastern Kenya. African Journal of Agriculture and Resource Economics, 10, 72–85.
- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G. & Sanchis, V. (2013) Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. Food and Chemical Toxicology, 60, 218–237.
- Marín, S., Ramos, A.J. & Sanchis, V. (2012) Modelling *Aspergillus flavus* growth and aflatoxins production in pistachio nuts. Food Microbiology, 32, 378–388.
- 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.
- Mauro, A., Battilani, P. & Cotty, P.J. (2015) Atoxigenic *Aspergillus flavus* endemic to Italy for biocontrol of aflatoxins in maize. BioControl, 60, 125–134.
- Medina, A., Rodriguez, A. & Magan, N. (2014) Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production. Frontiers in Microbiology, 5, 348.
- Mehdi Razzaghi-Abyaneh (2013) Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects.
- Meissonnier, G.M., Pinton, P., Laffitte, J., Cossalter, A.-M., Gong, Y.Y., Wild, C.P., Bertin, G., Galtier, P. & Oswald, I.P. (2008) Immunotoxicity of aflatoxin B1: impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression. Toxicology and applied pharmacology, 231, 142–9.
- 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.
- Mendez-Albores, A., De Jesus-Flores, F., Castaneda-Roldan, E., Arambula-Villa, G. & Moreno-Martinez, E. (2004a) The effect of toasting and boiling on the fate of B-aflatoxins during pinole preparation. Journal of Food Engineering, 65, 585–589.
- Mendez-Albores, J.A., Arambula-Villa, G., Loarca-Pina, M.G., Gonzalez-Hernandez, J., Castano-Tostado, E. & Moreno-Martinez, E. (2004b) Aflatoxins' fate during the nixtamalization of contaminated maize by two tortilla-making processes. Journal of Stored Products Research, 40, 87–94.
- Milani, J.M. (2013) Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: A review. Veterinari Medicina, 58, 405–411.
- Mishra, P.K., Kedia, A. & Dubey, N.K. (2015) Chemically characterized *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. essential oil for shelf life enhancer of herbal raw materials based on antifungal,

antiaflatoxic, antioxidant activity, and favorable safety profile. Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 3504, 1–10.

Mitchell, N.J., Bowers, E., Hurburgh, C. & Wu, F. (2016) Potential economic losses to the USA corn industry from aflatoxin contamination. Food Additives & Contaminants: Part A, 0049, 19440049.2016.1138545.

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.

Mohajeri, F.A., Amiri, A., Azad, H.K. & Ahmadi, Z. (2015) Original Article Occurrence of Aflatoxin M₁ in Raw and Pasteurized Milk Produced in Rafsanjan, Iran. Journal of Community Health Research, 4, 215–219.

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.

Montibus, M., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., Barreau, C. & Ponts, N. (2013) Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. Critical reviews in microbiology, 7828, 1–14.

De Muynck, C., Leroy, A.I.J., De Maeseneire, S., Arnaut, F., Soetaert, W. & Vandamme, E.J. (2004) Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. Microbiological Research, 159, 339–346.

N

Nakajima, M., Tsubouchi, H., Miyabe, M. & Ueno, Y. (1997) Survey of aflatoxin B₁ and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. Food and Agricultural Immunology, 9, 77–83.

Narasaiah, K. V., Sashidhar, R.B. & Subramanyam, C. (2006) Biochemical analysis of oxidative stress in the production of aflatoxin and its precursor intermediates. Mycopathologia, 162, 179–89.

Neeff, D. V., Ledoux, D.R., Rottinghaus, G.E., Bermudez, A. J., Dakovic, A., Murarolli, R. A. & Oliveira, C. A. F. (2013) *In vitro* and *in vivo* efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to bind and reduce aflatoxin residues in tissues of broiler chicks fed aflatoxin B₁. Poultry science, 92, 131–7.

Ni, M. & Yu, J.H. (2007) A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. PLoS ONE, 2, 1–9.

Nogueira, J.H.C., Gonçalves, E., Galletti, S.R., Facanali, R., Marques, M.O.M. & Felício, J.D. (2010) *Ageratum conyzoides* essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. International journal of food microbiology, 137, 55–60.

Nyandieka, H.S., Maina, J.O. & Nyanmwange, C. (2009) Destruction of Aflatoxins in Contaminated Maize Samples using Ammoniation Procedures. East and Central African Journal of Pharmaceutical Sciences, 12, 47–51.

O

Odhiambo, B.O., Murage, H. & Wagara, I.N. (2014) Screening for Atoxigenic *Aspergillus* Species and Evaluating their Inhibitory Potential against Growth and Sporulation of Aflatoxigenic *Aspergillus* Species. Egerton Journal of Science and Technology, 14, 61–80.

Ogunsanwo, B. & Faboya, O. (2005) Effect of roasting on the aflatoxin contents of Nigerian peanut seeds. African Journal of Biotechnology, 3, 451–455.

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.

Olarte, R.A., Horn, B.W., Dorner, J.W., Monacell, J.T., Singh, R., Stone, E.A. & Carbone, I. (2012) Effect of sexual recombination on population diversity in aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and evidence for cryptic heterokaryosis. Molecular Ecology, 21, 1453–1476.

Oliveira, C.P. de, Soares, N. de F.F., Oliveira, T.V. de, Baffa Júnior, J.C. & Silva, W.A. da (2013) Aflatoxin M1 occurrence in ultra high temperature (UHT) treated fluid milk from Minas Gerais/Brazil. Food Control, 30, 90–92.

Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z. & Naghdibadi, H. (2007) Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. Food Control, 18, 1518–1523.

Omidpanah, S., Sadeghi, H., Mohamadian, M. & Manayi, A. (2015) Evaluation of antifungal activity of aqueous extracts of some medicinal plants against *Aspergillus flavus*, pistachio aflatoxin producing fungus *in vitro*. Drug Development and Therapeutics, 6, 66–69.

Ortega, Y.R. (2008) Foodborne Diseases. Emerging infectious diseases, 14, 1181.

P

Paranagama, P.A., Abeysekera, K.H.T., Abeywickrama, K. & Nugaliyadde, L. (2003) Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. Letters in Applied Microbiology, 37, 86–90.

- Paterson, R.R.M. (2006) Fungi and fungal toxins as weapons. Mycological Research, 110, 1003–1010.
- Payne, G. a & Brown, M.P. (1998) Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. Annual review of phytopathology, 36, 329–362.
- Peltonen, K., el-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J. & Salminen, S. (2001) Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. Journal of dairy science, 84, 2152–2156.
- Perrone, G., Gallo, A. & Logrieco, A.F. (2014a) Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Europe in relation to the management of aflatoxin risk. Frontiers in microbiology, 5, 377.
- Perrone, G., Haidukowski, M., Stea, G., Epifani, F., Bandyopadhyay, R., Leslie, J.F. & Logrieco, A. (2014b) Population structure and Aflatoxin production by *Aspergillus* Sect. *Flavi* from maize in Nigeria and Ghana. Food Microbiology, 41, 52–59.
- 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, 725–735.
- Pitt, J.I. (1994) The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. Journal of Medical and Veterinary Mycology, 32 Suppl 1, 17–32.
- Pitt, J.I., Manthong, C., Siriacha, P., Chotechaunmanirat, S. & Markwell, P.J. (2015) Studies on the biocontrol of aflatoxin in maize in Thailand. Biocontrol Science and Technology, 25, 1070–1091.
- Piva, G., Galvano, F., Pietri, A. & Piva, A. (1995) Detoxification methods of aflatoxins. A review. Nutrition Research, 15, 767–776.
- 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.
- 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.
- Prado, G., De Carvalho, E.P., Oliveira, M.S., Cruz Madeira, J.G., Morais, V.D., Correa, R.F., Cardoso, V.N., Soares, T.V., Moreira Da Silva, J.F. & Pereira Gonçalves, R.C. (2003) Effect of gamma irradiation on the inactivation of aflatoxin B1 and fungal flora in peanut. Brazilian Journal of Microbiology, 34, 138–140.
- Prakash, B., Shukla, R., Singh, P., Kumar, A., Mishra, P.K. & Dubey, N.K. (2010) Efficacy of chemically characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. International Journal of Food Microbiology, 142, 114–119.
- Prakash, B., Singh, P., Kedia, A. & Dubey, N.K.K. (2012) Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and *in vivo* efficacy in food system. Food Research International, 49, 201–208.

- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P.K. & Dubey, N.K. (2015) Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges. Food Control, 47, 381–391.
- Prashar, A., Locke, I.C. & Evans, C.S. (2004) Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. Cell Proliferation, 37, 221–229.
- Price, M.S., Yu, J., Nierman, W.C., Kim, H., Pritchard, B., Jacobus, C.A., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E. & Payne, G.A. (2006) The aflatoxin pathway regulator AfIR induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. FEMS Microbiology Letters, 255, 275–279.
- Proctor, A.D., Ahmedna, M., Kumar, J.V. & Goktepe, I. (2004) Degradation of aflatoxins in peanut kernels/flour by gaseous ozonation and mild heat treatment. Food additives and contaminants, 21, 786–793.
- Prudente Jr., a D. & King, J.M. (2002) Efficacy and safety evaluation of ozonation to degrade aflatoxin in corn. Journal of Food Science, 67, 2866–2872.

R

- Ramamoorthy, V., Dhingra, S., Kincaid, A., Shantappa, S., Feng, X. & Calvo, A.M. (2013) The putative C2H2 transcription factor MtfA is a novel regulator of secondary metabolism and morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. PloS one, 8, e74122.
- Rasooli, I., Fakoor, M.H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A. & Rezaei, M.B. (2008) Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. International Journal of Food Microbiology, 122, 135–9.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M. & Perng-Kuang, C. (2010) Aflatoxins: Mechanisms of Inhibition by Antagonistic Plants and Microorganisms. Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology, 468 Pages.
- Reverberi, M., Zjalic, S., Punelli, F., Ricelli, A., Fabbri, A.A. & Fanelli, C. (2007) Apyap1 affects aflatoxin biosynthesis during *Aspergillus parasiticus* growth in maize seeds. Food additives and contaminants, 24, 1070–1075.
- Reverberi, M., Ricelli, A., Zjalic, S., Fabbri, A.A. & Fanelli, C. (2010) Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, 87, 899–911.
- Richard, J.L. (2007) Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. International Journal of Food Microbiology, 119, 3–10.
- Ricard, J.L. (2008) Discovery of aflatoxins and significant historical features. Toxin Reviews, 27:171–201
- Riley, R.T. & Norred, P. (1999) Mycotoxin prevention and decontamination - a case of study on maize. Food, Nutrition and Agriculture, 23, 25–32.

- Rodrigues, I. & Naehrer, K. (2012) A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. Toxins, 4, 663–75.
- Roze, L. V, Chanda, A. & Linz, J.E. (2011a) Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: A new understanding of established cellular processes. Fungal Genetics and Biology, 48, 35–48.
- Roze, L.V.L., Chanda, A., Wee, J., Awad, D. & Linz, J.E. (2011b) Stress-related transcription factor AtfB integrates secondary metabolism with oxidative stress response in *Aspergilli*. J Biol Chem, 286, 35137–35148.
- Roze, L. V, Hong, S.-Y. & Linz, J.E. (2013) Aflatoxin biosynthesis: current frontiers. Annual review of food science and technology, 4, 293–311.
- Rustom, I.Y.S. (1997) Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. Food Chemistry, 59, 57–67.
- D., Azuara, E. & Vazquez-Landaverde, P.A. (2014) Effect of added calcium hydroxide during corn nixtamalization on acrylamide content in tortilla chips. LWT - Food Science and Technology, 56, 87–92.

S

- Samson, R., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. & Andersen, B. (2010) Food and Indoor Fungi.
- 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) Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Studies in Mycology, 78, 141–73.
- Sánchez-Hervás, M., Gil, J. V., Bisbal, F., Ramón, D. & Martínez-Culebras, P. V. (2008) Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. International Journal of Food Microbiology, 125, 336–340.
- Sarikurkcü, C., Sabih Ozer, M., Eskici, M., Tepe, B., Can, S. & Mete, E. (2010) Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. longicaulis var. longicaulis. Food and chemical toxicology, 48, 1801–5.
- Saunders, H. & Watkins, F. (2001) Allergic contact dermatitis due to thiuram exposure from a fungicide, The Australasian Journal of Dermatology, 42 (3), 217–218.
- Schatzmayr, G. & Streit, E. (2013) Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: facts and figures. World Mycotoxin Journal, 6, 213–222.
- Schneider, E.P. & Dickert, K.J. (1994) Health Costs and Benefits of Fungicide Use in Agriculture: A Literature Review. Journal of Agromedicine, 1, 19–37.
- Selvam, R.M., Nithya, R., Devi, P.N., Shree, R.S.B., Nila, M.V., Demonte, N.L., Thangavel, C., Maheshwari, J.J., Lalitha, P., Prajna, N.V. & Dharmalingam, K. (2015) Exoproteome of *Aspergillus*

- flavus* corneal isolates and saprophytes: Identification of proteoforms of an oversecreted alkaline protease. Journal of Proteomics, 115, 23–35.
- Sétamou, M., Cardwell, K.F., Schulthess, F. & Hell, K. (1997) Infection and Aflatoxin Contamination of Preharvest Maize in Benin. Plant Disease, 81, 1323–1327.
- Shaaban, M.I., Bok, J.W., Lauer, C. & Keller, N.P. (2010) Suppressor mutagenesis identifies a velvet complex remediator of *Aspergillus nidulans* secondary metabolism. Eukaryotic cell, 9, 1816–24.
- Shams-ghahfarokhi, M., Kalantari, S. & Razzaghi-abyaneh, M. (2013) Terrestrial Bacteria from Agricultural Soils : Versatile Weapons against Aflatoxigenic Fungi. In *Aflatoxins-Recent Advances and Future Prospects*, chapter 2, pp 23-39.
- Shimizu, K., Hicks, J.K., Huang, T.P. & Keller, N.P. (2003) Pka, Ras and RGS Protein Interactions Regulate Activity of AfIR, a Zn(II)2Cys6 Transcription Factor in *Aspergillus nidulans*. Genetics, 165, 1095–1104.
- Shukla, R., Singh, P., Prakash, B. & Dubey, N.K. (2012) Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. Food Control, 25, 27–33.
- Siddappa, V., Nanjegowda, D.K. & Viswanath, P. (2012) Occurrence of aflatoxin M1 in some samples of UHT, raw & pasteurized milk from Indian states of Karnataka and Tamilnadu. Food and Chemical Toxicology, 50, 4158–4162.
- Silva, J.F.M. da, Peluzio, J.M., Prado, G., Madeira, J.E.G.C., Silva, M.O., De Moraes, P.B., Rosa, C.A., Pimenta, R.S. & Nicoli, J.R. (2015) Use of Probiotics to Control Aflatoxin Production in Peanut Grains. The Scientific World Journal, 2015, 1–8.
- Singh, P. & Srivastava, B. (2008) Journal of Herbs , Spices & Efficacy of Essential Oil of *Amomum subulatum* as a Novel Aflatoxin B 1 Suppressor. 6475, 37–41.
- 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. & 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.
- Sinha, K.K. & Bhatnagar, D. (1998) *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety* CRC Press.
- Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M. & Tarantilis, P. A. (2014) Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. Industrial Crops and Products, 53, 46–54.
- Škrbić, B., Živančev, J., Antić, I. & Godula, M. (2014) Levels of aflatoxin M1 in different types of milk collected in Serbia: Assessment of human and animal exposure. Food Control, 40, 113–119.

- Smith, M.-C., Madec, S., Coton, E. & Hymery, N. (2016) Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their *in vitro* Combined Toxicological Effects. Toxins, 8, 94.
- Sprote, P. & Brakhage, A.A. (2007) The light-dependent regulator velvet A of *Aspergillus nidulans* acts as a repressor of the penicillin biosynthesis. Archives of Microbiology, 188, 69–79.
- Steyn, P.S. (1995) Mycotoxins, general view, chemistry and structure. Toxicology Letters, 82-83, 843–851.
- Stone, R. (2002) Peering Into the Shadows: Iraq’s Bioweapons Program. Sciences, 297, 1110–1113.
- Streit, E., Schatzmayr, G., Tassis, P., Tzika, E., Marin, D., Taranu, I., Tabuc, C., Nicolau, A., Aprodu, I., Puel, O. & Oswald, I.P. (2012) Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed--focus on Europe. Toxins, 4, 788–809.
- 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.
- Strijbis, K. & Distel, B. (2010) Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism. Eukaryotic Cell, 9, 1809–1815.

T

- Takahashi, T., Chang, P.-K., Matsushima, K., Yu, J., Abe, K., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E. & Koyama, Y. (2002) Nonfunctionality of *Aspergillus sojae aflR* in a strain of *Aspergillus parasiticus* with a disrupted *aflR* gene. Applied and Environmental Microbiology, 68, 3737–3743.
- Taniwaki, M. H., Hocking, A. D., Pitt, J. I., Fleet, G. H. (2009) Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. International Journal of Food Microbiology, 132, 100-108.
- Tatsadjieu, N.L., Dongmo, P.M.J., Ngassoum, M.B., Etoa, F.X. & Mbofung, C.M.F. (2009) Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. Food Control, 20, 161–166.
- The Council of the European Communities (1991) COUNCIL DIRECTIVE of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market (91 /414/EEC). Official Journal of the European Communities.
- Throckmorton, K., Lim, F.Y., Kontoyiannis, D.P., Zheng, W. & Keller, N.P. (2016) Redundant synthesis of a conidial polyketide by two distinct secondary metabolite clusters in *Aspergillus fumigatus*. Environmental Microbiology, 18, 246–259.

- Tian, J., Huang, B., Luo, X., Zeng, H., Ban, X., He, J. & Wang, Y. (2012) The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. Food Chemistry, 130, 520–527.
- Tisserand, R. (1997) Essential Oil Safety III. Carcinogenesis, Phototoxicity. The International Journal of Aromatherapy, 8, 23–27.
- Tisserand, R. & Young, R. (1996) Essential Oil Safety II. Metabolism, Neurotoxicity, Reproductive Toxicity. The International Journal of Aromatherapy, 7, 187–482.
- Torres, A.M., Barros, G.G., Palacios, S.A., Chulze, S.N. & Battilani, P. (2014) Review on pre- and post-harvest management of peanuts to minimize aflatoxin contamination. Food Research International, 62, 11–19 .
- Tsitsigiannis, D.I., Dimakopoulou, M., Antoniou, P.P. & Tjamos, E.C. (2012) Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops. Phytopathologia Mediterranea, 51, 158–174.
- Tsitsigiannis, D.I. & Keller, N.P. (2006) Oxylipins act as determinants of natural product biosynthesis and seed colonization in *Aspergillus nidulans*. Molecular microbiology, 59, 882–92.

U

- Udoh, J.M., Cardwell, K.F. & Ikotun, T. (2000) Storage structures and aflatoxin content of maize in five agroecological zones of Nigeria. Journal of Stored Products Research, 36, 187–201.
- Diener, U. L., Davis, N. D. (1977) Aflatoxin formation in peanuts. Alabama Agricultural Experiment Station.
- USAID (2012) Aflatoxin: A synthesis of the research in health, agriculture, and trade.

V

- Varga, J., Baranyi, N., Chandrasekaran, M. & Vágvölgyi, C. (2015) Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: an update. Acta Biologica Szegediensis, 59, 151–167.
- Vayias, B.J., Athanassiou, C.G., Milonas, D.N. & Mavrotas, C. (2010) Persistence and efficacy of spinosad on wheat, maize and barley grains against four major stored product pests. Crop Protection, 29, 496–505.

W

- Wagacha, J.M. & Muthomi, J.W. (2008) Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. International Journal of Food Microbiology, 124, 1–12.

- Waliyar, F., Osiru, M., Sudini, H.K. & Njoroge, S. (2013) Reducing Aflatoxins in Groundnuts through Integrated Management and Biocontrol. In *Aflatoxins: Finding Solutions for Improved Food Safety*.
- Wang, B., Mahoney, N.E., Pan, Z., Khir, R., Wu, B., Ma, H. & Zhao, L. (2016) Effectiveness of pulsed light treatment for degradation and detoxification of aflatoxin B1 and B2 in rough rice and rice bran. *Food Control*, 59, 461–467.
- Wen, Y., Hatabayashi, H., Arai, H., Hiroko, K., Wen, Y., Hatabayashi, H., Arai, H., Kitamoto, H.K. & Yabe, K. (2005) Function of the cypX and moxY Genes in Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* Function of the cypX and moxY Genes in Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 3192–3198.
- Wheeler, M.H., Bhatnagar, D. & Klich, M.A. (1991) Effects of Chlobenthiazole on Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 41, 190–197.
- Wild, C.P., Rasheed, F.N., Jawla, M.F.B., Hall, A.J., Jansen, L.A.M. & Montesano, R. (1991) In-utero exposure to aflatoxin in West Africa. *The Lancet*, 337, 1602.
- Wild, C.P. & Turner, P.C. (2002) The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*, 17, 471–481.
- Wilkinson, J.R., Kale, S.P., Bhatnagar, D., Yu, J. & Ehrlich, K.C. (2011) Expression profiling of non-aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus* mutants obtained by 5-azacytosine treatment or serial mycelial transfer. *Toxins*, 3, 932–48.
- Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M. & Aggarwal, D. (2004) Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 1106–1122.
- Wu, F. (2013) Cost-Effectiveness of Interventions to Reduce Aflatoxin Risk.
- Wu, F., Groopman, J.D. & Pestka, J.J. (2014) Public health impacts of foodborne mycotoxins. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 351–372.
- Wu, F. & Khlangwiset, P. (2010) Health economic impacts and cost-effectiveness of aflatoxin-reduction strategies in Africa: case studies in biocontrol and post-harvest interventions. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 27, 496–509.

X

- Xu, X., Liu, L., Zhang, F., Wang, W., Li, J., Guo, L., Che, Y. & Liu, G. (2014) Identification of the first diphenyl ether gene cluster for pestheic acid biosynthesis in plant endophyte *Pestalotiopsis fici*. *ChemBioChem*, 15, 284–292.

Y

- Yeh, F., Yu, M.C., Mo, C., Luo, S., Tong, M.J. & Henderson, B.E. (1989) Hepatitis B Virus, Aflatoxins, and Hepatocellular Carcinoma in Southern Guangxi, China. Cancer Research, 49, 2506–2509.
- Yin, W. & Keller, N.P. (2011) Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. Journal of Microbiology (Seoul, Korea), 49, 329–339.
- Yu, J. (2012) Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. Toxins, 4, 1024–57.
- Yu, J. & Ehrlich, K. (2011) Aflatoxin biosynthetic pathway and pathway genes. Aflatoxins–Biochemistry and Molecular Biology.
- 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.
- Yu, J.H., Butchko, R. a E., Fernandes, M., Keller, N.P., Leonard, T.J. & Adams, T.H. (1996) Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene *aflR* from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. Current Genetics, 29, 549–555.

Z

- Zain, M.E. (2011) Impact of mycotoxins on humans and animals. Journal of Saudi Chemical Society, 15, 129–144.
- Zheng, N., Sun, P., Wang, J.Q., Zhen, Y.P., Han, R.W. & Xu, X.M. (2013) Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk and pasteurized milk in China market. Food Control, 29, 198–201.
- Zhou, L., Wei, D.-D., Selvaraj, J.N., Shang, B., Zhang, C.-S., Xing, F.-G., Zhao, Y.-J., Wang, Y. & Liu, Y. (2015) A strain of *Aspergillus flavus* from China shows potential as a biocontrol agent for aflatoxin contamination. Biocontrol Science and Technology, 25, 583–592.
- Zhuang, Z., Lohmar, J.M., Satterlee, T., Cary, J.W. & Calvo, A.M. (2016) The Master Transcription Factor *mtfA* Governs Aflatoxin Production, Morphological Development and Pathogenicity in the Fungus *Aspergillus flavus*. Toxins, 8, 1–16.

Maîtrise du risque aflatoxique: utilisation d'extraits naturels et mise en évidence de leurs mécanismes d'action

Sous la direction de: Pr. Jean-Denis Bailly et Dr. André El Khoury

L'aflatoxine B1 (AFB1) est une mycotoxine contaminant de nombreux substrats agricoles, notamment les céréales, arachides, pistaches, graines de coton et autres fruits secs. Elle est génotoxique, agit comme un initiateur de la cancérogenèse et elle est classée par le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) dans le groupe I des molécules carcinogènes pour les hommes et les animaux. Cette toxine est produite par des espèces fongiques appartenant essentiellement au genre *Aspergillus* et à la section *Flavi*; *A. flavus* étant l'espèce la plus préoccupante. Cette espèce peut se développer à la fois au champ ou lors du stockage des matières premières après récolte. Plusieurs études montrent qu'un grand nombre de denrées alimentaires destinées à l'alimentation humaine et animale sont contaminées par les aflatoxines mettant en évidence la faible efficacité ou l'insuffisance des stratégies actuelles utilisées pour la maîtrise de cette contamination.

L'objectif principal de cette étude est le développement d'une stratégie alternative basée sur l'utilisation de produits naturels et visant à réduire la production de la toxine par les moisissures aflatoxinogènes. Grâce à l'élaboration d'un outil moléculaire regroupant un ensemble de gènes impliqués directement ou indirectement dans la biosynthèse de l'AFB1, ce travail permet de mieux comprendre le mécanisme d'action moléculaire de composés anti-aflatoxinogènes. Des extraits aqueux de plantes méditerranéennes ont été testés pour leur efficacité à inhiber l'aflatoxinogénèse. Ainsi, l'extrait aqueux d'hysope, *Micomeria graeca*, présente des propriétés anti-aflatoxinogènes importantes sans modification de la croissance fongique. Son effet inhibiteur sur plusieurs souches productrices d'aflatoxines ainsi que son mécanisme d'action ont été caractérisés. Ce dernier semble impliquer des gènes pivots dans la régulation des métabolismes fongiques primaire et secondaire ainsi que des voies impliquées dans la réponse cellulaire au stress oxydatif. Ces travaux permettent de valider l'utilisation d'extraits naturels comme stratégie alternative de lutte contre la contamination des aliments par les aflatoxines.

Mots clés : Aflatoxine B1, *Aspergillus flavus*, stratégie de lutte, extraits naturels, mécanisme d'action, stress oxydatif.

Discipline :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Intitulé et adresse du laboratoire :

Institut National de la Recherche Agronomique - INRA

Unité Toxalim - UMR 1331, Équipe Biosynthèse et Toxicité des Mycotoxines

180, chemin de Tournefeuille - B.P. 93173

31027 Toulouse cedex 9 - France

Aflatoxin risk management: use of natural extracts and identification of their mechanisms of action

Supervised by: Pr. Jean-Denis Bailly and Dr. André El Khoury

Aflatoxin B1 (AFB1) is a mycotoxin contaminating numerous agricultural commodities such as cereals, peanuts, pistachios, cottonseed and other dried fruits. It is a genotoxic initiating carcinogenesis and is classified by the IARC (International Agency for Research on Cancer) in the group I of molecules that are carcinogenic for humans and animals. This toxin is produced by fungal species mainly belonging to the *Flavi* section of the *Aspergillus* genus, *A. flavus* being the most preoccupying species. This species can develop both in the field and during storage of commodities following harvest. Several studies show that a significant number of food and feedstuffs are contaminated by aflatoxins, highlighting the feeble efficiency or the shortfall of the strategies currently used to prevent such contamination.

The main objective of this study is the development of an alternative strategy based on the use of natural products and aiming the reduction of toxin production by aflatoxinogenic fungi. Through the elaboration of a molecular tool grouping a number of genes directly or indirectly linked to AFB1's biosynthesis, this work allows a better understanding of the molecular mechanism of action of anti-aflatoxinogenic compounds. Aqueous extracts of Mediterranean plants were tested for their ability to inhibit aflatoxinogenesis. Thus, hyssop's aqueous extract - *Micomeria graeca* - is shown to present significant anti-aflatoxinogenic properties without reducing fungal growth. Its inhibiting effect in other AFB1-producing species and its mechanism of action were both characterized. The latter seems to involve pivotal genes in fungal primary and secondary metabolisms as well as genes implicated in the fungal cellular response to oxidative stress. These works allocate the use of natural extracts as an alternative strategy to counteract aflatoxin contamination of food and feed.

Keywords: Aflatoxin B1, *Aspergillus flavus*, prevention strategies, natural extracts, mechanism of action, oxidative stress.

Discipline:

Pathology, Toxicology, Genetics and Nutrition

Heading and address of the laboratory:

National Institute for Agricultural Research - INRA

Toxalim - UMR 1331, Biosynthesis and Toxicity of Mycotoxins team

180, chemin de Tournefeuille - B.P. 93173

31027 Toulouse cedex 9 - France