

N° d'ordre (INP) :
(USJ) :

THESE

Présentée pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

École doctorale Transferts, Dynamique des Fluides, Energétiques et Procédés

Spécialité : Génie des procédés et de l'environnement

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE SAINT JOSEPH DE BEYROUTH

École doctorale Sciences et Santé

Spécialité : Sciences de la Vie

Par

André EL KHOURY

**Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1
(AFB1) dans les vignobles libanais : Occurrence et Origine**

Soutenue le 3 Juillet 2007 devant le jury composé de :

M. A. LEBRIHI : Directeur de thèse. Professeur INP-ENSAT. Toulouse
M. T. RIZK : Directeur de thèse. Professeur Fac. des Sciences. USJ.Beyrouth
M. S. ROUSSOS. Rapporteur. Directeur de Recherche. IRD. Marseille
M. R. SALIBA. Rapporteur. Professeur Fac. d'Agronomie. UL. Beyrouth
Mme. M-L. DELIA. Membre. Maître de conférences INP-ENSIACET. Toulouse
M. R. LTEIF : Membre. Professeur assistant Fac. des Sciences. USJ. Beyrouth

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Génie Chimique (UMR 5503, CNRS-INPT-UPS) au sein du Département « Bioprocédés et Systèmes Microbiens » à l'École Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT-INPT) sous la direction scientifique de Monsieur le Professeur Ahmed LEBRIHI et au Centre d'Analyses et de Recherches de la Faculté des Sciences de l'Université Saint-Joseph (FS-USJ) sous la direction scientifique de Monsieur le Professeur Toufic RIZK. Je tiens à leur exprimer toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements pour leur accueil bienveillant au sein des deux laboratoires, pour leurs conseils très précieux et leurs encouragements ainsi que pour la confiance qu'ils m'ont constamment témoignée.

A Monsieur Roger LTEIF, Professeur assistant et directeur du Département de chimie de la Faculté des Sciences de l'Université Saint-Joseph, pour votre présence, votre soutien et vos conseils tout au long de ces années, je serai toujours reconnaissant.

A Madame Marie-Line Délia, maître de conférence à l'Eensiacet-INP de Toulouse, vous m'avez toujours encouragé, soutenu et guidé. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez témoigné et vous suis reconnaissant de la disponibilité et de l'intérêt. Soyez assurée de mon estime et de ma profonde reconnaissance.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Sevastianos ROUSSOS, directeur de Recherche à l'Institut de Recherches pour le Développement (IRD-Marseille) d'avoir accepté de participer à ce jury et de juger ce travail en tant que rapporteur. Je lui suis très reconnaissant pour ces judicieuses suggestions.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Rachad SALIBA, Professeur et Ingénieur de Recherche à la faculté d'agronomie de l'Université Libanaise pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Je lui suis très reconnaissant pour toute l'intention particulière qu'il a porté à la correction de cet ouvrage.

A mon cher Ami, Docteur Ali ATOUI, pour votre grand cœur et toute l'attention que vous m'avez accordée, Gardez cette bonne humeur qui vous caractérise, quelle chance on a de vous avoir parmi nous.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à Madame Hayat AZOURI TANNOUS Professeur et directeur de laboratoire de Toxicologie à la faculté de Pharmacie de l'Université Saint-Joseph, pour ses conseils, sa collaboration et son aide durant les analyses.

J'exprime toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements à Madame Yolla GHORRA directrice de la faculté d'Agronomie (ESIAM-ESIA) de l'Université Saint-Joseph pour son aide précieuse, ses encouragements et son soutien, il serait impossible d'oublier.

Je ne saurais oublier Madame Annie LESZKOWICZ Professeur à l'ENSAT de Toulouse et Madame Florence MATHIEU maître de conférence au sein de notre laboratoire, pour leur gentillesse, leurs encouragements et leur sympathie.

Mes remerciements vont également à toute l'équipe du Laboratoire de Génie Chimique ENSIACET-ENSAT, j'ai passé des moments agréables avec vous tous. Je vous souhaite à tous une réussite dans tous les domaines, professionnel et personnel mais j'espère que les nombreux kilomètres qui nous séparerons peut-être ne seront jamais un frein à notre amitié et à notre rencontre

Liste des abréviations

OTA: Ochratoxine A

AFB1: Aflatoxine B1

UV: Ultra-Violet

Ex: Excitation

Em: Emission

IR: Infrarouge

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

MS : Spectrométrie de Masse

IARC (CIRC) : Centre Internationale de Recherche sur le Cancer

TCN : Néphropathie Chronique Tunisienne

NEB : Néphropathie Endémique du Balkan

DL₅₀ : Dose létale qui tue 50% des individus

GRAS: Generally Regarded As Safe

FDA: Food and Drug Administration

CE: Commission Européenne

CPDA: Comité Permanent des Denrées Alimentaires

JEFCA: Joint Expert Committee of Food Additives

DRBC: Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar

CYA: Czapeck Yeast Extract Agar

SGM: Synthetic Grape Medium

Temp : Température

AW : Activité de l'eau

RH: Humidité Relative

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

FLD: Fluorimetric Detection

ELISA: Enzyme Linked Immuno sorbent Assay

IAC: Immuno Affinity Column

PCR: Polymerase Chain Reaction

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

ITS: Internal Transcribed Sequence

IGS: Intergenic Spacer

Liste de publications et communications

PUBLICATIONS

EL Khoury, A., Rizk, T., Lteif, R., Azouri, H., Delia, M-L., Lebrihi, A. 2006. Occurrence of ochratoxin A and aflatoxin B1-producing fungi in Lebanese grapes and OTA content in musts and finished wines during year 2004. J.Agric. Food Chem. 54(23), 8977-8982.

EL Khoury, A., Rizk, T., Lteif, R., Azouri, H., Delia, M-L., Lebrihi, A. 2007. Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine grapes and musts. Soumise in the journal of Food and Chemical Toxicology.

POSTER PRESENTATION

EL Khoury, A., Rizk, T., Lteif, R., Azouri, H., Delia, M-L., Lebrihi, A. Occurrence de l'Ochratoxine A et de l'Aflatoxine B1 dans les vignobles libanais. VIIIth International Symposium Of Œnologie 2007, Bordeaux, France.

Tables des Matières

Introduction	1
Revue bibliographique	5
Propriétés Physico-chimiques de l'Ochratoxine A et de l'Aflatoxine B1	6
I-1. L'Ochratoxine A (OTA).....	7
I-1.1. Définition et structure chimique.....	7
I-1.2 Autres Ochratoxines	7
I-2. Propriétés physico-chimiques de l'Ochratoxine A	8
I-3. L'Aflatoxine B1 (AFB1)	10
I-3.1. Définition et structure chimique.....	10
I-4. Propriétés physico-chimiques des Aflatoxines	11
Profil Toxicologique	13
I-5. Ochratoxine A.....	14
I-5.1.Néphrotoxicité	14
I-5.2. Génotoxicité.....	14
I-5.3. Immunotoxicité.....	16
I-5.4. Tératogénicité	17
I-5.5. Neurotoxicité	17
I-5.6. Cancérogenèse.....	17
I-6. Aflatoxine B1	18
I-6.1. Hépatotoxicité.....	18
I-6.2. Génotoxicité et Mutagénicité	18
I-6.3. Immunotoxicité.....	19
I-6.4.Tératogénicité	20
Champignons Mycotoxinogènes	21
I-7 Principales moisissures mycotoxinogènes.....	22
I-7.1 Le genre <i>Aspergillus</i>	22
Aspects macroscopiques du genre <i>Aspergillus</i>	24
Aspects microscopiques	25
I-7.1.1 <i>Aspergillus</i> et production d'OTA	27
a- <i>Aspergillus</i> de la section <i>Nigri</i>	27
a.1 Clefs d'identification	28
• Unisiriés	28
• Bisiriés	29
• Les espèces non communes	30
b- <i>Aspergillus flavi</i> et la production des aflatoxines.....	32
b.1 <i>A. flavus</i>	32

b.2 <i>A. parasiticus</i>	33
I-7.2. Le genre <i>Penicillium</i>	35
a- Définition.....	35
b- Caractéristiques morphologiques	35
c- <i>Penicillium verrucosum</i> l'espèce ochratoxinogène	36
c.1 Définition	36
c.2 Description morphologique	36
c.3 Caractères microscopiques et macroscopiques générales.....	38
I-8. Détection, identification et quantification des champignons mycotoxinogènes par méthodes moléculaires.....	38
a- Principe de la PCR	39
I-8.1 Les régions d'ADN cibles pour la détection et la quantification moléculaire des champignons mycotoxinogènes	39
a- L'ADN ribosomal nucléaire et mitochondrial	39
b- Séquences des fragments obtenus par AFLP, RFLP, RAPD.....	40
c- Les régions d'ADN codant pour des mycotoxines.....	41
Ecotoxigénèse	43
I-9. Facteurs physiques.....	44
I-9.1. La température	44
I-9.2 Activité de l'eau (Aw)	45
I-10. Facteurs chimiques	46
I-10.1 Composition gazeuse	46
I-10.2 Traitements agricoles.....	47
I-10.3 Nature du substrat	47
I-11. Facteurs biologiques	48
Contamination Alimentaire	49
I-12. Origine des mycotoxines et produits contaminés	50
I-12.1 Dans les céréales	51
I-12.2 Dans les oléagineux	52
I-12.3 Dans les fruits et légumes	52
I-12.4 Dans les viandes et produits de charcuterie	53
I-12.5 Dans le lait et les produits laitiers	53
I-12.6 Dans les autres produits.....	54
I-13 Ochratoxine A et filière raisin.....	54
I-14 Aflatoxine B1 et filière raisin	58
Réglementation et Législation	59
I-15. Ochratoxine A.....	60
I-16. Aflatoxine B1	61
II- Matériel et Méthodes	65

II-1. Produits et Appareillage	66
II-2. Milieux de cultures	66
II-3 Méthodes.....	70
II-3-1. Etude et analyse des vins finis libanais.....	70
II-3-1.1 Collecte des échantillons.....	70
II-4. Dosage d’OTA	72
II-4.1 Test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	72
a- Principe	72
b- Mode opératoire	72
II-4.2 Dosage par HPLC.....	73
II-4.2.1 Extraction de l’OTA du moût et du vin après purification sur colonne d’immuno- affinité	73
a-Principe	74
b-Purification sur colonne d’immuno-affinité.....	74
II-4.2.2 Analyse de l’OTA par HPLC-FLD.....	75
II-4.3 Dosage de l’AFB1	76
II-4.3.1 Extraction de l’AFB1 à partir du moût après purification par extraction liquide- liquide	76
a-Extraction à partir du moût	76
b-Extraction chloroformique.....	77
c-Concentration de l’extrait final	77
II-4.3.2 Dosage de l’AFB1 par HPLC-FLD.....	77
II-5. Etude et caractérisation de la microflore fongique de raisins.....	78
II-5.1 Echantillonnage des grappes de raisins.....	78
II-5.2 Isolement et identification de la microflore fongique	79
a- Isolement.....	79
b- Identification	79
b-1. Descriptif des champignons appartenant au genre <i>Aspergillus</i>	79
b-1.1 Le groupe des <i>Aspergillus Nigri</i>	80
b-1.2 Le groupe des <i>Aspergillus flavi</i>	81
b-2. Descriptif des champignons appartenant au genre <i>Penicillium</i>	81
c-1. Extraction de l’OTA et de l’AFB1	82
II-5.3 Etude de la croissance et de la production d’AFB1 sur milieu SGM par des souches aflatoxinogènes de la section <i>flavi</i>	83
II-6. Caractérisation génétique des souches de la section <i>flavi</i>	83
II-6.1 Extraction rapide de l’acide nucléique fongique (ADN)	83
a- Solution de lyse	84
b- Extraction d’ADN.....	84
II-6.2 La PCR (Polymerase Chain Reaction).....	85

a-Protocole.....	85
II-6.3 Electrophorèse sur gel d'agarose	86
a- Préparation du gel et migration	86
b- Analyse du gel	86
III- Résultats et Discussion.....	87
III-1. Etat de lieux des vins Libanais.....	88
III-2. Description de la population fongique totale.....	90
III-3. Description des populations fongiques mycotoxinogènes	92
III-4. Evolution des populations fongiques totales et mycotoxinogènes	93
III-4.1 Selon le stade de maturité.....	93
III-4.2 Selon les régions.....	94
a- Contexte géographique et climatique	94
b- Description de la population fongique totale	96
c- Description de la population fongique mycotoxinogène	97
III-5. Teneurs en OTA et AFB1 dans les échantillons de moûts	98
III-6. Evolution de la teneur en OTA et en AFB1 en fonction de différentes étapes de vinification.....	100
Occurrence of Ochratoxin A and Aflatoxin B1-producing Fungi in Lebanese grapes and OTA content in musts and finished wines during year 2004 (Publication 1)	106
Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine-grapes and musts (Publication 2)	129
III-7. Etude de la croissance des souches aflatoxinogènes sur milieu modèle.....	157
III-8. Etude de la production de l'AFB1 sur milieu modèle	160
III-9. Caractérisation moléculaire des isolats de la section <i>flavi</i> par PCR-RFLP	163
Conclusion générale et Perspectives.....	171
Références bibliographiques	176

Listes des Tableaux

Tableau 1 : Désignation des ochratoxines en fonction des différents groupements R1, R2, R3, R4 et R5 de la figure 2	8
Tableau 2 : Caractéristiques spectrales de l'Ochratoxine A.....	9
Tableau 3 : Points de fusion et données spectrales des aflatoxines	11
Tableau 4 : Mycotoxines et champignons responsables de leur production.....	22
Tableau 5 : Caractéristiques morphologiques au sein de la section <i>Nigri</i>	31
Tableau 6 : Caractéristiques morphologiques d' <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i>	34
Tableau 7 : Activité de l'eau optimale pour la croissance de certaines espèces de champignons <i>Aspergillus sp.</i> et <i>Penicillium sp.</i>	46
Tableau 8 : Moisissures et mycotoxines retrouvées dans divers aliments.....	50
Tableau 9 : Exemples de produits contaminés par des moisissures toxigéniques.....	51
Tableau 10 : Contamination des vins en fonction de leurs natures, pour différents pays européens.....	56
Tableau 11 : Teneurs maximales en aflatoxines B et G et en aflatoxine M ₁ admissibles dans diverses denrées alimentaires selon le règlement (CE) N°1525/98 de la Commission Européenne	64
Tableau 12 : Composition en termes de cépage des vins analysés et origine des échantillons	71
Tableau 13 : Caractères morphologiques des espèces d' <i>Aspergillus Nigri</i>	80
Tableau 14 : Caractères morphologiques des espèces d' <i>Aspergillus flavi</i>	81
Tableau 15 : Taux de contamination des vins finis par l'OTA	89
Tableau 16 : Incidence et potentiel mycotoxinogènes au sein des isolats fongiques au cours de l'étude.....	93
Tableau 17 : Occurrence d' <i>A. carbonarius</i> et d' <i>A. flavus</i> sur les grappes et présence d'OTA et d'AFB1 sur le moût dérivé en 2004.....	99
Tableau 18 : Occurrence d' <i>A. carbonarius</i> et d' <i>A. flavus</i> sur les grappes et présence d'OTA et d'AFB1 sur le moût dérivé en 2005.....	100
Tableau 19 : Production de l'AFB1en µg/g SGM par 3 souches de la section <i>flavi</i> en fonction de l'Aw, la température et le temps	160
Tableau 20 : Traitement statistique des résultats obtenus concernant la production de l'AFB1 en fonction de la température et l'Aw ainsi que leur interaction	161

Listes de figures

Figure 1 : structure chimique de l'Ochratoxine A.....	7
Figure 2 : Structure générale des Ochratoxines	8
Figure 3 : Structure chimique de l'Aflatoxine B1	10
Figure 4 : Structures chimiques et masses molaires (en g) des différentes aflatoxines..	11
Figure 5 : Quelques métabolites de l'Ochratoxine A	16
Figure 6 : <i>A. japonicus</i> , a1, tête avec des stérigmates courtes unisériées, (x 740). a2, conidies fortement echinulées, (x 1720)	28
Figure 7 : Conidiophore aspergillaire bisérié	29
Figure 8 : <i>A. carbonarius</i> (A-1157, UAB Mycology group), tête (c1) et conidies (c2)	29
Figure 9 : <i>A. niger</i> agrégats (A-219, UAB Mycology group), tête (b1) et conidie (b2)	30
Figure 10 : <i>A.flavus</i> , A : Conidiophores 250X, B : Conidiophores 900X, C : Conidies 1470X	33
Figure 11 : <i>A. parasiticus</i> , A et B : Conidiophores 900X, C : Conidies 1470X.....	34
Figure 12 : <i>Penicillium</i> mono, bi, tri et quadriverticillé.....	36
Figure 13 : Colonie de <i>P. Verrucosum</i> après 7 jours sur milieu CYA.....	37
Figure 14 : <i>P.verrucosum</i> après 7 jours sur milieu MEA	37
Figure 15 : Conidies de <i>P. Verrucosum</i> 1400X.....	38
Figure 16 : Organisation des gènes ribosomiques chez les champignons.....	40
Figure 17 : Effet de la température et l'activité de l'eau sur le développement des champignons du genre <i>Aspergillus nigri</i>	46
Figure 18 : Contribution de certaines denrées alimentaires à la prise diététique moyenne d'OTA dans certains pays de la Communauté Européenne	54
Figure 19 : Évolution de la flore mycélienne et de la teneur en OTA en fonction des stades de maturation de la grappe	55
Figure 20 : Nombre des échantillons totaux de vins rouges et ceux contaminés en OTA dans différents pays Européens.....	56
Figure 21 : Nombre des échantillons totaux de vins blancs et ceux contaminés en OTA dans différents pays Européens	57
Figure 22 : Localisation géographique du vignoble libanais, carte des terroirs concernés	70
Figure 23 : Schéma descriptif des différentes étapes d'analyse des échantillons du vin.....	75
Figure 24 : Représentation des zones de prélèvements (carrés) des grappes de raisin sur une parcelle	78
Figure 25 : Représentation schématique de la procédure expérimentale allant de la grappe de raisin passant par l'isolement et l'identification des espèces productrices de mycotoxines arrivant à l'étude du pouvoir producteur	82

Figure 26 : Répartition des deux genres isolés <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> sur les deux années d'études	91
Figure 27 : Répartition des espèces du genre <i>Aspergillus</i> sur les deux années d'études	92
Figure 28 : Evolution de la population fongique totale et mycotoxinogène en fonction du stade de maturité au cours de l'étude.....	94
Figure 29 : Zone des vignobles concernée par l'étude.....	95
Figure 30 : Températures et humidités moyennes de la région de la Békaa centrale pour les deux années 2004 et 2005. T moy : Température moyenne ; HR moy : Humidité relative moyenne	96
Figure 31 : Occurrence de la population fongique totale dans les régions concernées par l'étude durant les deux stades de maturation en 2004 et 2005	97
Figure 32 : Représentation du nombre des isolats mycotoxinogènes au sein du nombre total des isolats durant les années (a) : 2004 et (b) : 2005.....	98
Figure 33 : Evolution de la teneur en OTA de différents échantillons en fonction des différentes étapes de vinification A :(2004) ; B :(2005) ; DFA : Début Fermentation Alcoolique ; FFA : Fin Fermentation Alcoolique ; FML : Fermentation Malo-Lactique ; ELE : Elevage	101
Figure 34 : Evolution de la teneur en AFB1 de différents échantillons en fonction des différentes étapes de vinification A :(2004) ; B :(2005) ; DFA : Début Fermentation Alcoolique ; FFA : Fin Fermentation Alcoolique ; FML : Fermentation Malo-Lactique ; ELE : Elevage	101
Figure 35 : Croissance des souches en fonction de la température. S1 : Souche 1 ; S2 : souche 2.....	158
Figure 36 : Croissance des souches en fonction de l'Aw. S1 : Souche 1 ; S2 : souche 2	159
Figure 37 : Electrophoretogramme montrant le résultat de digestion de la séquence ITS (ITS1-ITS4) amplifiée à partir de l'ADN génomique des souches de la section <i>flavi</i> , par l'enzyme HaeIII	165
Figure 38 : Electrophoretogramme montrant le résultat de l'amplification de la séquence IGS (690 Pb) (IGSF : 5' AAG GAA TTC AGG AAT TCT CAA TTG 3' et IGSR : 5' GTC CAC CGG CAA ATC GCC GTG CG 3') des souches isolées de la section <i>flavi</i>	166
Figure 39 : Alignement entre les régions IGS (<i>aflR</i> - <i>aflJ</i>) des deux espèces références <i>A. flavus</i> (SK 20) et <i>A. parasiticus</i> (Strain 2999) et les variations génétiques qu'il a montré	167
Figure 40 : Migration théorique (CLC workbench program) du produit PCR après restriction de la séquence IGS (690 Pb) par l'enzyme Bgl II des deux espèces <i>A. flavus</i> (SK 20) et <i>A. parasiticus</i> (Strain 2999).....	168
Figure 41 : Electrophoretogramme montrant le résultat de la digestion de la séquence IGS amplifiée à partir de l'ADN génomique des souches isolées de la section <i>flavi</i>	169

Introduction

La prévention des risques de contamination des produits alimentaires par les mycotoxines, constitue un enjeu majeur pour l'ensemble des opérateurs des filières de l'agroalimentaire. Les cas d'intoxication ont de tout temps défrayé la chronique et peuvent avoir des conséquences économiques très graves.

Avec l'évolution de la société, le consommateur est devenu plus soucieux de sa sécurité alimentaire, et il demande à être protégé de mieux en mieux contre les risques de contamination. Tandis que les professionnels de l'agro-industrie prennent des mesures de plus en plus strictes pour garantir l'innocuité des aliments, les pouvoirs publics mettent également en place des normes de plus en plus sévères pour prévenir au mieux les risques sanitaires.

Parmi la multitude de contaminants connus à nos jours, les mycotoxines sont des substances naturelles produites par métabolisme secondaire des moisissures et exercent un pouvoir toxique réel pour le consommateur (homme et animal) une fois introduites même en faibles concentrations (Eskola, 2002 ; Bennet, 1987). On connaît assez peu les conditions de contamination par les champignons responsables de cette production, celles de leurs proliférations, ainsi que les conditions de production des mycotoxines par ces micro-organismes.

Actuellement, il existe plus de 300 métabolites secondaires fongiques recensés mais seule une trentaine posséderait des caractéristiques toxiques préoccupantes (Pfohl-Leszkowicz, 1999). La même toxine peut être élaborée par diverses espèces fongiques mais pas obligatoirement par toutes les souches appartenant à une même espèce (Eskola, 2002).

Parmi les métabolites les plus toxiques, on retrouve notamment l'ochratoxine A (OTA) qui est un contaminant majeur de l'alimentation des animaux d'élevage (volailles, porcs, vaches) par l'intermédiaire des céréales (première source de prise en OTA) et des farines et de celle de l'homme par le biais de la chaîne alimentaire ; et L'aflatoxine B1 (AFB1), la mycotoxine la plus occupante et la plus toxique qui contamine aussi bien l'alimentation animale et humaine surtout par l'intermédiaire des céréales.

Avec le développement de moyens analytiques performants, il a été facile de mettre en évidence la présence de l'OTA dans le vin (Zimmerli et Dick, 1996). Cette contamination des vins par l'OTA a été liée à la contamination des vignobles par des champignons de la section *Nigri* du genre *Aspergillus* où *Aspergillus carbonarius* s'avère l'espèce majeure productrice de cette mycotoxine.

Des travaux récents sur la recherche de l'OTA dans le vin (Béjaoui *et al.*, 2006, Battilani *et al.*, 2002 ; Filali *et al.*, 2001 ; Ospital *et al.*, 1998) ont mis en évidence la présence de cette mycotoxine dans le vignoble méditerranéen. Ceci a été rapporté à ce que les conditions climatiques méditerranéennes sont favorables pour la croissance des champignons et par suite pour la production de cette mycotoxine. Cependant aucune information n'a été donnée concernant la contamination des vins par l'AFB1 ni des vignobles par les champignons causals de cette mycotoxine.

Jusqu'au début de notre étude, on ne disposait d'aucune information sur la contamination des vins libanais par rapport à cette molécule, l'Ochratoxine A, la célèbre mycotoxine des vins, mais aussi sur la situation des vignobles vis-à-vis de l'occurrence des champignons mycotoxinogènes

Notre travail visait donc à:

- 1- Faire une enquête sur l'OTA dans les vins finis du Liban.
- 2- Identifier et caractériser la microflore fongique mycotoxinogène qui contamine les vignobles libanais.
- 3- Déterminer le pouvoir producteur des espèces isolées vis-à-vis des mycotoxines qu'elles produisent.
- 4- Estimer le taux des mycotoxines en question dans les moûts dérivés des grappes collectées.
- 5- Etudier la réaction des souches mycotoxinogènes isolées vis-à-vis de la température et de l'activité de l'eau (Aw), deux facteurs majeurs influençant la croissance des champignons et définissant ainsi leur toxigénèse.

6- Caractériser au niveau moléculaire les espèces isolées dans le but de développer une nouvelle technique d'identification des champignons réduisant ainsi le temps et le coût d'analyse.

I- Revue Bibliographique

Propriétés Physico-Chimiques
de l'Ochratoxine A et de l'Aflatoxine B1

I-1. L'Ochratoxine A (OTA)

I-1.1. Définition et structure chimique :

En 1928, au Danemark, une nouvelle néphropathie est apparue chez les cochons, et ce n'est qu'en 1966 que sa cause fut déterminée : l'Ochratoxine A (OTA) (Botton *et al.*, 1990). L'OTA est une mycotoxine, dérivée de la famille des dihydrocoumarines. Son nom chimique est : « **L-phénylalanine-N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-méthyl-1-oxo-1H₂-benzopyrane-7yl) carbonyl]-(**R**)-isocoumarine » (*figure 1*) (Ratulo *et al.*, 2004 ; Delage *et al.*, 2003 ; Serra *et al.*, 2002 ; Aboul-Enein *et al.*, 2002 ; Soleas *et al.*, 2001).**

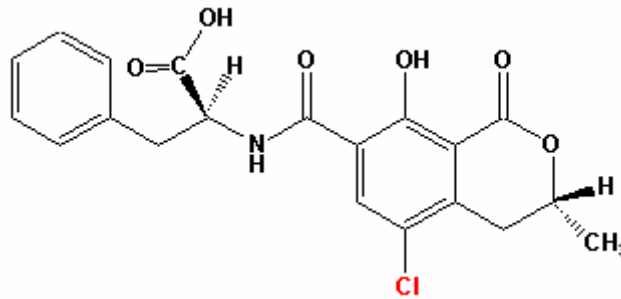


Figure 1: structure chimique de l'ochratoxine A (Eskola, 2002).

I-1.2 Autres Ochratoxines :

Plusieurs métabolites apparentés à l'OTA ont été identifiés : l'Ochratoxine B (OTB) l'analogue déchloré de l'OTA, l'Ochratoxine C (OTC) l'ester éthylique de l'OTA et l'Ochratoxine α (Ota), dérivé isocoumarique de l'OTA ainsi que son analogue déchloré, l'Ochratoxine β (OT β) (Moss, 1996 ; Höler, 1998 ; Miller et Trenholm, 1994 ; Trivedi *et al.*, 1992). La figure 2 présente la structure générale de ces différentes Ochratoxines et le tableau 1 récapitule pour chacune la composition des groupements caractéristiques.

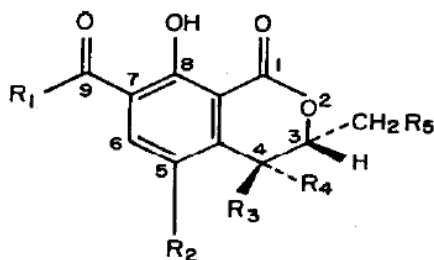


Figure 2 : Structure générale des Ochratoxines

Tableau 1 : Désignation des ochratoxines en fonction des différents groupements R1, R2, R3, R4 et R5 de la figure 2 (Höler, 1998)

Nom	R1	R2	R3	R4	R5
Ochratoxines naturelles					
Ochratoxine A	Phénylalanine	Cl	H	H	H
Ochratoxine B	Phénylalanine	H	H	H	H
Ochratoxine C	Ester éthylique, phénylalanine	Cl	H	H	H
Ester méthylique Ochratoxine A	Ester méthylique, phénylalanine	Cl	H	H	H
Ester méthylique Ochratoxine B	Ester méthylique, phénylalanine	H	H	H	H
Ester éthylique Ochratoxine B	Ester éthylique, phénylalanine	H	H	H	H
Ochratoxine α	OH	Cl	H	H	H
Ochratoxine β	OH	H	H	H	H
4-R-Hydroxyochratoxine A	Phénylalanine	Cl	H	OH	H
4-s-Hydroxyochratoxine A	Phénylalanine	Cl	OH	H	H
10-Hydroxyochratoxine A	Phénylalanine	Cl	H	H	OH
Analogue tyrosine de l'OTA	Tyrosine	Cl	H	H	H
Analogue sérine de l'OTA	Sérine	Cl	H	H	H
Analogue hydroxyproline de l'OTA	Hydroxyproline	Cl	H	H	H
Analogue lysine de l'OTA	Lysine	Cl	H	H	H
Ochratoxines Synthétiques					
d-Ochratoxine A	d-phénylalanine	Cl	H	H	H
Amide éthylique d'OTA	Amide éthylique, phénylalanine	Cl	H	H	H
O-méthyl Ochratoxine A	Phénylalanine, OHCH ₃ en C-8	Cl	H	H	H
Lactone ouvert Ochratoxine A	Phénylalanine	Cl	H	H	-

I-2. Propriétés physico-chimiques de l'Ochratoxine A :

L'OTA est un acide organique faible ayant un pKa de 7,1 (Miller et Trenholm, 1994 ; Bredenkamp *et al.*, 1989) et une masse molaire de 403,8 g/mol. De structure cristalline

variant de l'incolore au blanc, elle possède une intense fluorescence en lumière UV, de couleur verte en milieu acide et bleue en milieu alcalin (IARC, 1993 ; Budavri, 1989). A pH acide et neutre, l'OTA est soluble dans les solvants organiques polaires (alcools, cétones, benzène, chloroforme) mais faiblement soluble dans l'eau et insoluble dans les éthers de pétrole et les hydrocarbures saturés. A pH alcalin, elle est soluble dans une solution aqueuse de bicarbonate de sodium ainsi que dans les solutions alcalines en général. Cristallisée dans le benzène, cette molécule possède un point de fusion proche de 90°C, par contre ce point s'élève à 169°C lorsqu'elle est cristallisée dans le xylène. Les caractéristiques spectrales de l'OTA sont décrites dans le tableau 2.

Tableau 2 : Caractéristiques spectrales de l'Ochratoxine A

SPECTRES	SOLVANTS	CARACTERISTIQUES	REMARQUES	REFERENCES
UV-VIS	ETOH	$\lambda_{max} = 213\text{nm}$ ($\epsilon 36.800$) $\lambda_{max} = 332\text{nm}$ ($\epsilon 6.400$)	Le spectre d'absorption varie avec le pH et la polarité du solvant	Miller et Trenholm 1994
EMISSION FLUORESCENCE	ETOH 96% ETOH /ABS.	$\lambda_{max} = 467\text{nm}$ $\lambda_{max} = 428\text{nm}$	-----	Miller et Trenholm 1994
IR	CHCl ₃	3380; 2988; 1723; 1674; 1528; 1425; 1381; 1304; 1260; 1170; 1140; 1107; 827 cm ⁻¹	-----	Steyn 1984
RMN ¹H250-MHZ	CDCl ₃	δ 12,70; δ 10,80; δ 8,55 (3H); δ 7,23; δ 7,15 (H Aromatiques); δ 4,71; δ 5,07 (CH); δ 2,78; δ 3,2 (CH ₂); δ 1,55 (CH ₃)	-----	De Jesus et al ; Pachter et Wessels 1980 ; Weisleder et Lillehoj 1980
MS	----	m/z 239/241 m/z 255/257 ion moléculaire m/z 403	-----	Abramson 1987 ; Bauer et Gareis 1987

La particularité de l'Ochratoxine A est due à sa stabilité élevée, elle est résistante à l'acidité et aux hautes températures. Ainsi, une fois contaminées, les denrées alimentaires peuvent difficilement être débarrassées de cette molécule. Müller a démontré en 1982 que l'OTA n'est que partiellement dégradée lors des conditions normales de la cuisson. De plus, l'OTA peut résister pendant 3 heures à un autoclavage de 121°C (Trivadi *et al.*, 1992; IARC, 1976) et même à 250°C, sa destruction n'est pas complète (Boudra *et al.*, 1995). L'irradiation gamma (jusqu'à 7,5 Mrad) d'OTA en solution dans l'éthanol ne provoque aucune dégradation. Cependant une dégradation est observée dans le cas d'un faible taux d'humidité et lors d'un traitement en excès d'hypochlorite de sodium (NaOCl) (Castegnaro *et al.*, 1991). L'exposition à la lumière fluorescente est un facteur de dégradation.

I-3. L'Aflatoxine B1 (AFB1)

I-3.1. Définition et structure chimique :

À la suite d'une maladie « Turkey X disease » qui a affecté la volaille en Angleterre, et plus particulièrement les dindons, Sargeant *et al.*, (1996) ont isolé de la nourriture de ces volailles à base d'arachide, une substance capable d'induire expérimentalement la même maladie. Ce fut le début d'une série de recherches qui aboutit en 1965 à l'isolement et à la caractérisation de la structure des aflatoxines (Asao *et al.*, 1963 et 1965).

Une des plus célèbres mycotoxines est possédant le profil toxicologique le plus sérieux, l'aflatoxine B1 (AFB1) dont le nom chimique est le suivant : **6-Méthoxy-difurocoumarone2,3,6 α ,9 α -tétrahydro-4-méthoxy-cyclopenta-[c]furo[3',2':4,5]furo [2,3-h][l]benzopyran-1,11-dione (figure 3).**

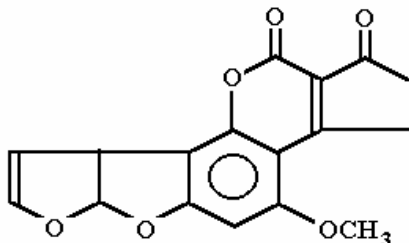


Figure 3: Structure chimique de l'aflatoxine B1.

Des dérivés secondaires de l'AFB1 (AFB2, AFG1, AFG2, AFM1) ont été identifiés. Ils sont caractérisés au niveau moléculaire par des structures de coumarines bifuraniques auxquelles sont accolées des pentanones (AFB) ou des lactoses hexatomiques (AFG).

Toutes les aflatoxines se rattachent à l'un de ces deux types de structure (AFB, AFG) et ne diffèrent entre elles que par la position de divers radicaux sur le noyau. Les structures chimiques ainsi que les masses molaires de ces différents dérivés sont représentés dans la figure 4.

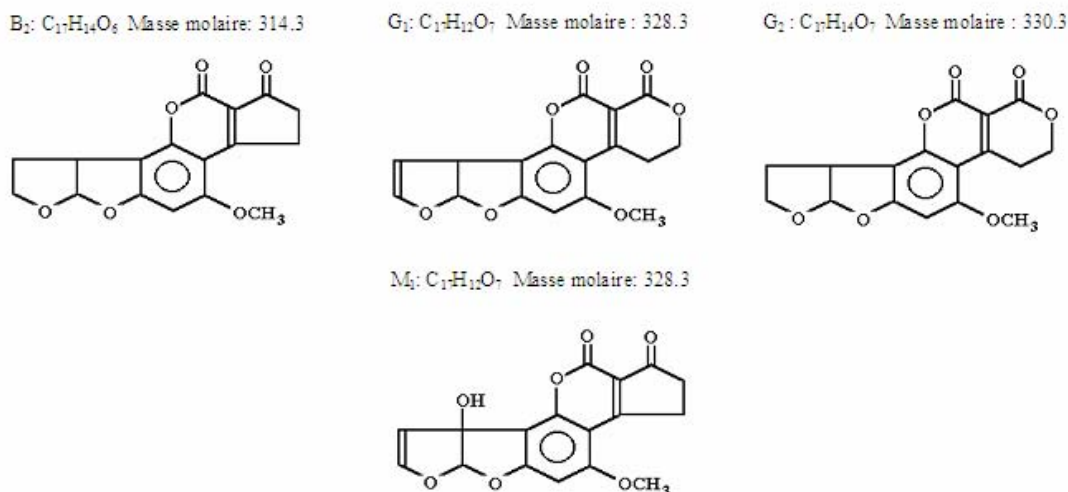


Figure 4: Structures chimiques et masses molaires (en g) des différentes aflatoxines.

I-4. Propriétés physico-chimiques des Aflatoxines :

Les aflatoxines sont des cristaux incolores ou jaune pâle-fluorescents de façon très intense sous une lumière ultra-violette. Les aflatoxines B₁ et B₂ émettent une fluorescence bleue et les aflatoxines G₁, G₂, une fluorescence vert jaune. Ces couleurs de fluorescence sont à l'origine du nom des mycotoxines (B pour *Blue* et G pour *Green*). L'aflatoxine M₁ présente une fluorescence bleu-violette sous irradiation ultra-violette. Le M vient de *Milk*, car ce métabolite a été tout d'abord isolé du lait (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Les points de fusion et les données spectrales des différentes aflatoxines sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Points de fusion et données spectrales des aflatoxines.

Aflatoxines	Point de Fusion °C	Spectre d'absorption en lumière Ultra Violette (Solution dans l'éthanol)	
		λ_{max} (nm)	ϵ
B1	268-269 (décomposition) (cristalisation dans le chloroforme)	223	25 600
		265	13 400
		362	21 800
B2	287-289 (décomposition) (cristalisation dans un mélange de chloroforme et de pentane)	222	17 000
		265	11 700
		363	23 400
G1	244-246 (décomposition) (cristalisation dans un mélange de chloroforme et de méthanol)	243	11 500
		257	9 900
		264	10 000
		362	16 100
G2	237-239 (décomposition) (cristalisation dans une solution d'acétate d'éthyle)	214	28 100
		265	11 600
		363	21 000
M1	299 (décomposition) (cristalisation dans une solution de méthanol)	226	23 100
		265	11 600
		357	19 000

Leur stabilité est très variée : dans l'eau elles sont généralement peu solubles (10-30 mg.ml⁻¹) présentant une instabilité totale dans les solvants non polaires (Cole et Cox, 1981). Par contre elles sont très solubles dans les solvants organiques de polarité moyenne (CHCl₃, CH₃OH, DMSO) (Cole et Cox, 1981).

Les aflatoxines se trouvent instables sous la lumière ultraviolette en présence d'oxygène avec des pH extrêmes (pH < 3 ou pH > 10). Par oxydation le cycle lactone des aflatoxines devient sensible à une hydrolyse alcaline, mais en cas de neutralisation, il peut se reformer. Les aflatoxines sont aussi dégradées par l'ammoniaque (NH₄OH) et l'hypochlorite de sodium (NaOCl). Lors de cette dernière réaction, il se forme le 2,3-dichloro-aflatoxine B1 qui est directement génotoxique (Cole et Cox, 1981).

Profil Toxicologique

I-5. Ochratoxine A

Le statut toxicologique de l'Ochratoxine A a été examiné de nombreuses fois et a fait l'objet d'une monographie complète par le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) en 1993 (IARC, 1993). À la suite de la découverte des néphropathies spontanées humaines et animales, des études expérimentales ont été menées afin de démontrer l'implication de l'OTA dans ces maladies. Des études toxicologiques réalisées sur des animaux de laboratoire (Zimmerli et Dick, 1996 ; Delage *et al.*, 2003 ; Da Rocha Rosa *et al.*, 2002 ; Shephard *et al.*, 2001 ; Visconti *et al.*, 1999 ; Ospital *et al.*, 1998 ; Otteneder *et al.*, 2000) ont montré que cette toxine peut avoir plusieurs effets, tel que des effets néphrotoxiques, génotoxiques, immunosuppresseurs, tératogènes, neurotoxiques et cancérigènes. Sa toxicité reste cependant très variable et dépend du sexe, de l'espèce et du type cellulaire (O'Brien *et al.*, 2001).

I-5.1. Néphrotoxicité

La néphropathie est l'effet toxique majeur de l'Ochratoxine A. Cette molécule est potentiellement néphrotoxique chez tous les mammifères non ruminants (Ribelin *et al.*, 1978). Des études épidémiologiques effectuées au Danemark, en Hongrie, en Scandinavie et en Pologne, ont montré que l'OTA joue un rôle majeur dans l'étiologie de la néphropathie porcine (Elling *et al.*, 1985).

L'OTA a été également associée à la néphropathie des humains (Lopez De Cerain *et al.*, 2002 ; Ospital *et al.*, 1998 ; Blesa *et al.*, 2004) et est suspectée en particulier être la cause de la maladie humaine fatale connue sous le nom de Néphropathie Endémique des Balkan (NEB). Il s'agit d'une tubulonéphrite interstitielle chronique affectant la population dans certaines régions du Sud-Est Européen, Croatie, Bosnie, Bulgarie et Roumanie (Ospital *et al.*, 1998 ; Visconti *et al.*, 1999 ; Markaki *et al.*, 2001 ; Blesa *et al.*, 2004). Elle serait également mise en cause dans la Néphropathie Tunisienne (TCIN) (Hassen *et al.*, 2004) affectant la population en Tunisie.

I-5.2. Génotoxicité

Si l'OTA a longtemps été considérée comme non génotoxique, les tests de mutagénicité donnant des résultats négatifs ou peu concluants. Dès la fin des années 1990, une théorie

différente est adoptée. La compréhension de la génotoxicité de l'OTA et les recherches expérimentales ont contredit cette affirmation (Hennig *et al.*, 1991 ; Dirheimer *et al.*, 1991). En 1991, Henning *et al.*, ont mis en évidence une activité mutagène importante de l'OTA métabolisée par des hépatocytes sur des souches bactériennes *Salmonella typhimurium* TA 1535, 1538, ainsi que sur des lymphocytes humains (*in vitro*). Ils ont observé une augmentation de l'incidence des échanges de matériel génétique entre chromatides soeurs. La preuve de la génotoxicité de l'OTA a été formellement démontrée par l'utilisation de systèmes *in vivo*. Des cassures de simple-brin ont été observées au niveau de l'ADN de rein, de foie, de rate des rongeurs, ainsi que des aberrations chromosomiques ont été observées sur le chromosome X de lymphocytes humains cultivés en présence de 15 mM d'OTA. Ce type d'aberration se retrouve chez les patients souffrant de la NEB (Monolova *et al.*, 1990).

Les adduits à l'ADN causés par l'OTA ont été mis en évidence dans plusieurs études de génotoxicité (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1991 ; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993). D'autres travaux publiés confirment que l'activité cytotoxique de l'OTA conduirait à des lésions de l'ADN (Gautier *et al.*, 2001 ; Zepnik *et al.*, 2001 ; Gross-Steinmeyer *et al.*, 2002).

Toujours concernant la toxicité de l'OTA, des études réalisées par El Adlouni *et al.*, (2000), et Omar *et al.*, (1990) ont permis d'observer que la biotransformation de cette mycotoxine implique le « cytochrome P450-dépendant » qui génère, par libération de radicaux libres et l'implication de certaines enzymes, une peroxydation des lipides et une formation d'intermédiaires métaboliques toxiques actifs qui se manifestent au niveau :

- de la coagulation sanguine,
- du métabolisme glucidique,
- de lésions oxydatives,
- de l'inhibition de la protéosynthèse par inhibition de l'ARN_t-synthétase.

Néanmoins, les formes d'OTA impliquées dans son pouvoir génotoxique ne sont pas exactement connues. Certains de ces métabolites sont représentés (figure 5). Les études doivent se poursuivre pour connaître précisément le mode d'action de l'OTA et les métabolites reliés à la génotoxicité.

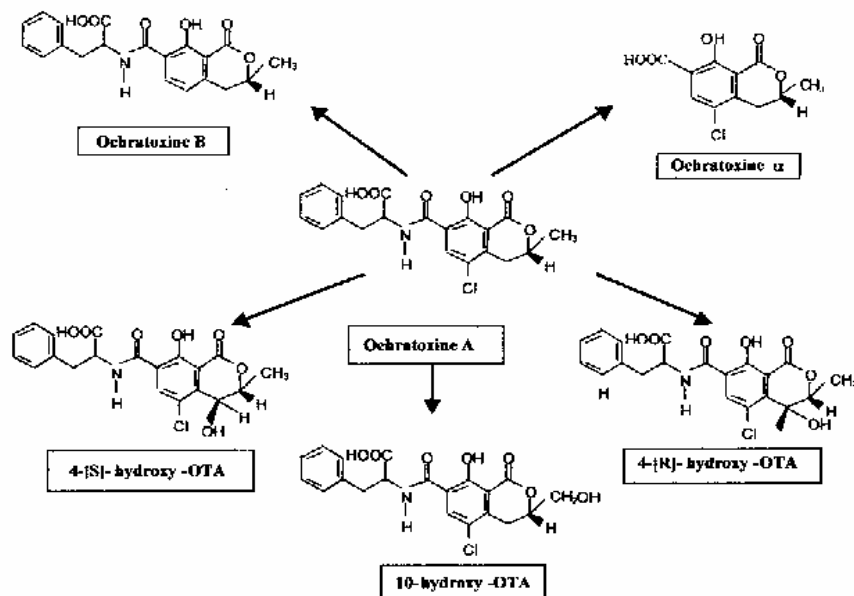


Figure 5: Quelques métabolites de l'Ochratoxine A (Pfohl-Leskowicz *et al.*, 1999).

I-5.3. Immunotoxicité

L'OTA présente, dans certaines conditions, un effet immunosuppresseur puissant. Cet effet est observé à faible ou à forte dose (Creppy *et al.*, 1991). Des nécroses des tissus lymphoïdes ont été rapportées, indiquant la grande sensibilité de ces tissus à l'OTA (Creppy *et al.*, 1991), mais aussi une atteinte de l'immunité humorale et cellulaire a été mise en évidence (Holmberg *et al.*, 1992). L'Ochratoxine A inhibe la prolifération des lymphocytes périphériques T et B et stoppe la production d'interleukine 2 (IL2) ainsi que ses récepteurs (Lea *et al.*, 1989). De plus, elle supprime l'activité de cellules tueuses (Killer) ainsi que la production d'interféron (Pfohl-Leskowicz, 1999).

L'OTA administrée à divers animaux provoque des effets variables au niveau de la moelle osseuse et de la réponse immunitaire.

Ainsi, cette molécule peut être à l'origine de :

- Lymphopénie,
- Régression du thymus,
- Suppression de la réponse immunitaire.

Suite à toutes les recherches faites, l'OTA est clairement donnée comme agent immunosupresseur (Petzinger *et al.*, 2002).

I-5.4. Tératogénicité

L'administration d'OTA chez l'animal est tératogène. Elle peut traverser le placenta et provoquer des anomalies morphologiques diverses chez les embryons de rat, souris, hamster, porc et poulet (Pfohl-Leszkowicz, 1999 ; Moré et Galtier 1978b). Toutefois, la gravité des malformations dépend de la voie d'administration et de la période gestative.

Les mécanismes de la tératogénicité induite par l'OTA n'ont pas été clairement définis mais il semble que le développement embryonnaire serait affecté à la fois par un effet direct de la molécule sur le fœtus et par un effet indirect via la mère (Petzinger *et al.*, 2002)

I-5.5. Neurotoxicité

Chez le rat l'administration d'OTA pendant la période de gestation induit des malformations du système nerveux central (Pfohl-Leszkowicz, 1999). De même, Eskola (2002) et Soleas *et al.* (2001) ont rapporté que l'OTA peut être considérée comme cause possible de certaines lésions ainsi que des dégâts au niveau cérébral. Cette substance s'avère donc hautement toxique pour les cellules nerveuses et apte d'atteindre le tissu neural (cerveau, rétine) (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

I-5.6. Cancérogenèse

Plusieurs études ont porté sur le développement de cancers expérimentaux chez des animaux nourris pendant quelques semaines avec des doses d'OTA variables. Il s'agit de tumeurs hépatiques mais surtout rénales (Huff *et al.*, 1992). Ainsi, l'OTA seule peut entraîner, chez les rongeurs, la formation de cancers du rein, du foie et des glandes mammaires. Il a été rapporté qu'une alimentation contaminée par cette toxine induit des adénomes rénaux et des carcinomes hépatocellulaires chez les souris et les rats, et elle est suspectée d'avoir des effets homologues chez les êtres humains surtout que sa durée de vie chez ces derniers est dix fois plus longue que chez les rats (Eskola, 2002). Suite à ces études, l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) a classé en 1993, l'OTA comme une molécule cancérigène possible pour les humains (groupe 2B) (IARC, 1993).

I-6. Aflatoxine B1

Les effets des aflatoxines sur la santé animale varient suivant l'espèce. Les animaux comme le veau, le poulet, le caneton, le cobaye et le porc sont sensibles à l'AFB₁ alors que la chèvre, le mouton, le rat et la souris sont relativement résistants (Patterson et Allcroft, 1970). L'AFB₁ est la plus toxique, suivie par ordre décroissant de toxicité par l'AFM₁, l'AFG₁, l'AFB₂ et l'AFG₂. Les toxicités des aflatoxines G₁, B₂ et G₂ sont respectivement 50, 80 et 90 % moindre que celle de l'AFB₁ (Cole et Cox, 1981 ; Terao et Ueno, 1978). L'aflatoxine provoque des toxicités aiguës au niveau de diverses cellules, incluant les cellules végétales (Dashek et Llewellyn, 1983 ; Bilgrami et Sinha, 1992), celles des invertébrés (Boutibonnes et Jacquet, 1971) et de divers vertébrés.

I-6.1. Hépatotoxicité

Newberne et Butler (1969) ont comparé la toxicité de l'AFB₁ chez la souris, le rat, le cobaye et le chat. La souris est relativement résistante aux effets hépatotoxiques (aigus et chroniques) que provoque l'AFB₁. Chez le rat, la toxicité dépend de l'âge et du sexe. Les jeunes rats et les mâles sont plus sensibles que les femelles. Le cobaye quant à lui est plus sensible et ne présente pas de différence sexuelle. Chez ces animaux, l'AFB₁ provoque une nécrose hépatique au niveau centrilobulaire. La susceptibilité des volailles est très variable suivant l'espèce. Chez le dindon, la maladie connue sous le nom de "*Turkey X disease*" entraîna la mort de 20 000 dindons après congestion et dilatation rénale en Angleterre en 1960 (Stevens *et al.*, 1960). Le chat est particulièrement sensible, la mort survenant entre 48 et 72 heures. Le foie des chats est enflé, pâle, friable et hémorragique. Une hépatotoxicité aiguë est aussi observée chez le singe (Madhavan *et al.*, 1965 ; Tulpule *et al.*, 1964 ; Newberne et Butler, 1969). Les DL 50 chez des jeunes singes oscillent entre 2,2 et 7 mg / kg p.c. suivant l'espèce (Rao et Gehring, 1971 ; Tulpule, 1981). Après intoxication aiguë par intubation gastrique, les lésions hépatiques deviennent des nécroses avec hémorragies (Svoboda *et al.*, 1966).

I-6.2. Génotoxicité et Mutagénicité

La bibliographie rapporte de très nombreuses études *in vitro* et *in vivo* effectuées pour détecter l'activité mutagène et génotoxique des aflatoxines. L'AFB₁, est de loin la toxine la

plus étudiée, cela s'explique par le fait qu'elle présente l'activité mutagène la plus importante. Les travaux *in vitro* (Puisieux *et al.*, 1991 ; Garner *et al.*, 1979 ; Groopman *et al.*, 1981) ont démontré le potentiel d'adduction des aflatoxines, soit à l'ADN d'origine animale ou humaine, soit à des oligonucléotides. Les études portant sur l'AFB1 ont été effectuées, soit par action directe de 8,9-époxyde, soit après transformation chimique par exemple par l'acide chloropéroxybenzoïque, soit enfin par activation métabolique. Elles ont permis de montrer que le site privilégié d'adduction était la guanine, tout particulièrement la position N7. La susceptibilité relative des mammifères et des espèces aviaires pourrait être expliquée par l'action combinée d'enzymes des microsomes et du cytosol sur le potentiel d'adduction des aflatoxines (Kumagai *et al.*, 1995).

Des études effectuées chez le rat montrent également que l'aflatoxine se lie à l'albumine plasmatique et qu'il existe une bonne corrélation entre les teneurs plasmatiques d'adduits et les niveaux d'adduction à l'ADN de foie (Wild *et al.*, 1986). Une étude comparée chez le rat (3 souches différentes), la souris, le hamster et le cochon d'Inde du potentiel d'adduction de l'AFB1 à l'ADN de foie et à l'albumine sérique a montré une relation effet-dose pour les deux types d'adduits chez toutes les espèces et pour toutes les souches (Wild *et al.*, 1996). Cette étude permet une extension de ce type d'analyse chez l'homme pour la détermination d'un marqueur biologique d'exposition.

I-6.3. Immunotoxicité

Il apparaît que des doses relativement importantes en aflatoxine (0,3 - 6 mg / kg p.c.), provoquent une dépression de la réponse immunitaire (Pier *et al.*, 1980 ; Pier, 1986). L'AFB1 supprime l'activité du complément C4, nécessaire à l'activité hémolytique normale et à la lyse des bactéries (Pier *et al.*, 1986). L'AFB1 diminue la production des interleukines 1 et 2 par les cellules T. Elle provoque aussi une hypoplasie du thymus (Pier, 1986). Les auteurs concluent qu'une exposition à de faibles doses chroniques d'AFB1 augmente la sensibilité de l'individu aux infections. Jakab *et al.*, (1994) ont réalisé des expériences démontrant que l'AFB1 peut provoquer des effets immunosuppresseurs après inhalation. Des rats mâles de la race Fischer 344 et des souris femelles de la race Swiss ont été exposés à l'AFB1, soit par inhalation d'aérosol, soit par instillation trachéale. Par inhalation, l'AFB1 supprime la phagocytose par les macrophages alvéolaires. Ces effets sont observés pour une dose de 16,8 µg / kg p.c. et persistent 2 semaines environ. Il faut une dose dix fois plus importante pour

obtenir le même effet par instillation trachéale. Par cette voie là, l'AFB₁ supprime la production du facteur alpha de nécrose tumorale et diminue la réponse du système immunitaire. Cela est particulièrement important car certaines personnes peuvent être soumises à l'AFB₁ par le biais de poussières provenant des graines contaminées. Les AFBs ont aussi des effets immunotoxiques chez le porc et les volailles.

I-6.4.Térogénicité

Les aflatoxines sont térogènes (Heathcote et Hibbert, 1978 ; Ong, 1975 ; Chu, 1977 ; Arora *et al.*, 1981). Chez le hamster, Elis et DiPaolo (1967) montrent qu'une administration d'une dose unique d'AFB₁ de 4mg/kg poids corporel par voie intra- péritonéale durant la gestation conduisait à une forte proportion de malformations, voire à des avortements. À la dose de 2 mg / kg, il n'y a pas de malformation fœtale. Elle est également térogène pour le rat alors qu'aux mêmes doses, elle ne l'est pas pour les souris C3H (DiPaolo *et al.*, 1967 ; Grice *et al.*, 1973). Arora *et al.*, (1981) relatent que chez la souris CBA gestante, l'administration d'une dose unique d'AFB₁ par intubation provoque des anomalies fœtales (exencéphalie et saillie de l'intestin), uniquement lorsque l'exposition a eu lieu le 8ème jour de gestation mais pas au jour suivant.

Champignons Mycotoxinogènes

I-7 Principales moisissures mycotoxinogènes :

Les mycotoxines sont produites par 5 genres de champignons : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria* (Miller et Trenholm, 1994). Plusieurs sortes de mycotoxines sont retrouvées dans les aliments (tableau 4), seules certaines contaminent l'alimentation humaine et sont toxiques pour la santé humaine. Les plus importantes sont : les aflatoxines, les ochratoxines, les trichothécènes, la stérigmatocystine, la zéaralénone, la citrinine, la patuline, l'acide pénicillique, les fumonisines (D'Mello et McDonald, 1997 ; Scudamore et Livesey, 1998).

Tableau 4 : Mycotoxines et champignons responsables de leur production

Champignons	Toxines
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxine Stérigmatocystine Ochratoxine A
<i>Penicillium</i>	Patuline, Citrinine, Pénitrem A, Acide cyclopiazonique, ochratoxine A
<i>Fusarium</i>	Trichothécènes (DON, NIV, Toxine T-2, DAS) Zéaralénone, Fumonisines, Fusarine, Moniliformine
<i>Alternaria</i>	Alternariol Acide Ténuazonique
<i>Claviceps</i>	Alcaloïdes de l'Ergot

Les champignons majeurs connus comme précurseurs de l'OTA et de l'AFB1 qui sont impliquées dans la chaîne alimentaire humaine et animale, appartiennent principalement aux genres : *Aspergillus* et *Penicillium* (Delage *et al.*, 2003 ; Lopez De Cerain *et al.*, 2002 ; Filali *et al.*, 2001 ; Otteneder et Majerus, 2000).

I-7.1 Le genre *Aspergillus*:

Capables de se développer dans le sol et les détritiques, dans les composts et sur les végétaux malades, la plupart des *Aspergillus* sont saprophytes. Ils colonisent les végétaux déjà abîmés

par des blessures, des piqûres d'insectes ou des attaques d'autres champignons. Mais ils sont aussi présents sur la surface des graines. Dans les mauvaises conditions de stockage, ces champignons peuvent évoluer et devenir des parasites.

Les champignons appartenant à ce genre sont responsables de maladies chez l'homme et les animaux (aspergillose pulmonaire, allergies ou mycotoxicoses). Cependant ils sont aussi capables de produire des acides organiques et des pigments utiles en alimentation et en industrie (Schuster *et al.*, 2002).

En 1729, Micheli fut le premier à mettre en place une taxonomie du genre *Aspergillus* et en 1926 Thom et Church établirent la première classification complète du genre.

Publiée en 1965, la monographie de Raper et Fennell, « the genus *Aspergillus* » reconnaît près de 132 espèces réparties en 3 grandes divisions en fonction de la présence ou non de métule. Ce n'est qu'en 1985 que Samson et Pitt ont proposé la création de sous-genres et de section.

Définition

Les champignons du genre *Aspergillus* appartiennent au sous-embranchement des *Ascomycotina* par leur mode de reproduction sexuée.

Le stade anamorphe

Il correspond au stade asexué. Le mycélium végétatif est formé d'hyphes septés colorés ou non. Une cellule hyphale à parois épaisse donne naissance au conidiophore. Celui-ci se termine par une vésicule de forme allongée, elliptique ou globuleuse donnant naissance aux cellules fertiles conidiogènes portant les conidies. La zone fertile de la vésicule s'appelle le stérigmate. Il peut être unisérié : les cellules conidiennes naissent alors directement des phialides ; ou bisérié : présence des métules entre la vésicule et les phialides.

Le stade téléomorphe

Il correspond au stade sexué et se caractérise par la présence de cleistothèces. Ce sont des formations sclérifiées à parois épaisses.

Aspects macroscopiques du genre Aspergillus

Les caractéristiques macroscopiques des colonies permettent l'identification des *Aspergillus*. Selon Raper et Fennell (1965), leur identification dépendra des paramètres suivants :

La couleur de la partie aérienne

Elle résulte de l'association du mycélium, des têtes conidiennes, des cléistothèces ou des sclérotés. C'est le premier critère de classification des *Aspergillus*.

La pigmentation de la base du mycélium et du substrat sous-jacent

Sur certains milieux de culture, les *Aspergillus* se pigmentent. Ce caractère n'étant pas absolu, il ne peut être utilisé comme critère de classification au niveau de l'espèce.

La vitesse de croissance

Pour une température et un milieu donnés, la croissance observée en un temps « t » ainsi que le diamètre atteint sur un milieu défini sont caractéristiques de chaque espèce. Une colonie d'*Aspergillus* se développe en général entre 2 à 7 jours.

La structure marginale des colonies

Les contours de la colonie varient : ils peuvent être épais, minces, lisses, rugueux et lobés.

La texture de la surface de croissance de la colonie

Elle peut avoir un aspect floconneux, velouté... ce caractère permet le diagnostic.

Le mycélium basal

Il peut être fin ou dense, fragile ou résistant, plan ou tordu.

La production de zones

Les zones sont dues à la production en alternance de têtes conidiennes et des sclérotés en cercles concentriques.

La production des corémies

Les corémies sont des agrégations mycéliennes fertiles, souvent observées sur des substrats naturels.

Aspects microscopiques

L'identification microscopique des *Aspergillus* se fait à partir des éléments caractéristiques suivants :

La tête conidienne

La couleur, la forme, la taille et la disposition des têtes conidiennes sont caractéristiques des sections auxquelles ces espèces sont rattachées.

La cellule du pied (Foot cell) du conidiophore

Elle représente le premier élément du développement de la structure conidienne. Cette cellule à paroi épaisse donne généralement naissance à un seul conidiophore qui va croître perpendiculairement à l'axe de celle-ci.

Le conidiophore

Souvent unique, le conidiophore donne une seule tête conidienne. La hauteur totale entre la cellule du pied et la vésicule, le diamètre du conidiophore, et la présence de septa sont importants dans la description des espèces. L'aspect externe de la paroi du conidiophore est un critère d'identification des sections d'*Aspergillus* : elle peut être lisse, rugueuse ou granuleuse.

Le conidiophore peut être de couleur jaune pâle ou brillant, brunâtre ou hyalin.

La vésicule

Elle résulte de l'élargissement de la partie apicale du conidiophore. Sa couleur est la même que celle du conidiophore. Sa forme et sa taille sont caractéristiques de chaque espèce. Dans la section *Circumdati*, la vésicule est globuleuse à sub-globuleuse devenant plus ou moins allongée chez les espèces à petite tête.

Le stérigmate

Il correspond à la zone fertile de la vésicule donnant naissance aux cellules conidiennes. La conidie est produite par une phialide chez les espèces unisériées ou par l'intermédiaire de la métule chez les espèces bisériées. Dans ce cas les métules se développent alors en premier, et quand leur croissance est maximale, les phialides apparaissent à leur sommet.

Les conidies

Elles sont issues du bourgeonnement de l'extrémité de la phialide. Les conidies forment souvent des chaînes conidiennes dans lesquelles elles sont reliées par un pont : le disjoncteur. Leur taille, leur couleur et leur forme sont caractéristiques de chaque espèce. Dans la section *Circumdati*, les conidies sont globuleuses, sub-globuleuses, ovales ou elliptiques ; leur paroi est lisse, rugueuse ou échinulée ; elles sont hyalines ou colorées.

Le cleistothèce, l'ascospore, et les cellules de la coque

Ces trois éléments n'apparaissent que pendant la reproduction sexuée des *Aspergillus*. Cette phase sexuée se traduit par l'apparition d'une formation sclérifiée à parois plus ou moins épaisses, le cleistothèce. Dans celui-ci se trouvent des asques sporulant en huit ascospores. L'asque est formé de deux lentilles convexes ressemblant à une bivalve ; sa surface peut être lisse, rugueuse ou échinulée...

Les cellules de la coque ou « hull cells », parfois appelées cellules noisettes constituent la paroi externe de certains cleistothèces mais peuvent être produites par des champignons pour lesquels on ne connaît pas la phase sexuée. Elles sont vésiculuses, globuleuses, elliptiques ou allongées...

Le sclérote

C'est une masse à paroi épaisse composée de cellules parenchymateuses de forme, de taille et de couleur caractéristiques. Il se rencontre chez certaines espèces comme *A. robustus* par exemple et parfois chez *A. flavus*. Toutefois, ce n'est pas un élément fiable dans l'identification des espèces.

I-7.1.1 *Aspergillus* et production d'OTA

L'OTA a été originellement décrite en 1965 comme métabolite d'*Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe *et al.*, 1965). Dans les années suivantes, d'autres espèces productrices d'OTA ont été identifiées comme par exemple celles appartenant à la section *Circumdati* (*A. alliicus*, *A. sclerotiorum* et *A. sulfureus*) (Varga *et al.*, 1996). Les céréales s'avèrent la matière alimentaire la plus contaminée par l'OTA (Olsson *et al.*, 2002 ; puntaric *et al.*, 2001).

La section « *Nigri* » est aussi très importante vu l'ochratoxigénicité qui a été récemment attribuée à certains de ses représentants : *A. niger* (Abarca *et al.*, 1994 ; Ono *et al.*, 1995) et *A. carbonarius* (Horie, 1995 ; Wicklow *et al.*, 1996) sont considérés comme contaminants majeurs de certaines denrées tropicales et subtropicales tels que les raisins et dérivés (Zimmerli et Dick, 1996) et le café.

a- *Aspergillus* de la section *Nigri*:

Les espèces de cette section sont capables de se développer à des températures comprises entre 6°C et 47°C avec une température optimale de 35°C -37°C (Schuster *et al.*, 2002). Elles peuvent croître à une activité de l'eau (A_w) de 0.88 et résistent à des valeurs de pH allant de 1,4 à 9,8. Ils sont donc plus présents dans les régions tempérées chaudes comme les pays du bassin méditerranéen et certaines régions de l'Amérique latine et l'Afrique du Sud (Schuster *et al.*, 2002).

D'après Schuster *et al.* (2002), en 1965, on dénombrait 13 espèces dans ce groupe, cependant en 1990, ce groupe a été réduit à 6 espèces en se basant sur des analyses de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Ces espèces sont : *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus*, *A. niger* et *A. tubingensis*. Les deux dernières espèces sont morphologiquement difficiles à distinguer et sont toutes les deux appelées communément *A. niger* ou *A. niger agrégates*. Ces deux espèces ont été récemment distinguées par leur capacité à produire l'OTA, *A. niger* serait productrice et *A. tubingensis*, non productrice. Cependant, tous les rapports sont d'accord sur le fait que la production d'ochratoxine A par *A. niger* est peu commune, étant produite en culture pure par seulement 1 à 2% des isolats (Abarca *et al.*, 1994, Heena *et al.*, 1998).

a.1 Clefs d'identification

Selon Abarca *et al.* (2004), les espèces du groupe « *Nigri* » peuvent être classés et différenciés en 4 groupes : (1) les unisiriés, les bisiriés renfermant (2) *A. carbonarius* et (3) *A. niger aggregate* et (4) les formes non communes.

• Unisiriés

Les unisiriés, représentés par *A. japonicus* et *A. aculeatus*, constituent un groupe d'intérêt économique. *A. japonicus* Saito et *A. aculeatus* Izuka, sont deux microorganismes libellés GRAS (de l'anglais : « Generally Regarded As Safe ») et largement utilisés en industrie fermentaire pour la fabrication de sauce de soja au Japon (Botton *et al.*, 1990; Pařenicová *et al.*, 1997). Ce groupe est parfaitement séparé des *A. niger aggrégats* (Pařenicová *et al.*, 2001) et des bisiriés de façon générale (Varga *et al.*, 2003). Sur la base de différentes méthodes de classification, plusieurs auteurs évoquant similarités (Raper et Fennell, 1965 ; Al-Musallam, 1980 ; Kusters van Someren *et al.*, 1991 ; Hamari *et al.*, 1997 ; Yokoyama *et al.*, 2001) et différences (Klich et Pitt, 1988 ; Kozakiewicz, 1989 ; Mégnégneau *et al.*, 1993 ; Visser *et al.*, 1996 ; Pitt and Hocking, 1997 ; Hamari *et al.*, 1997 ; Pařenicová *et al.*, 1997, 2000, 2001) entre ces deux taxons restent finalement partagés entre leur regroupement en tant qu'espèce unique ou leur séparation en deux espèces distinctes.

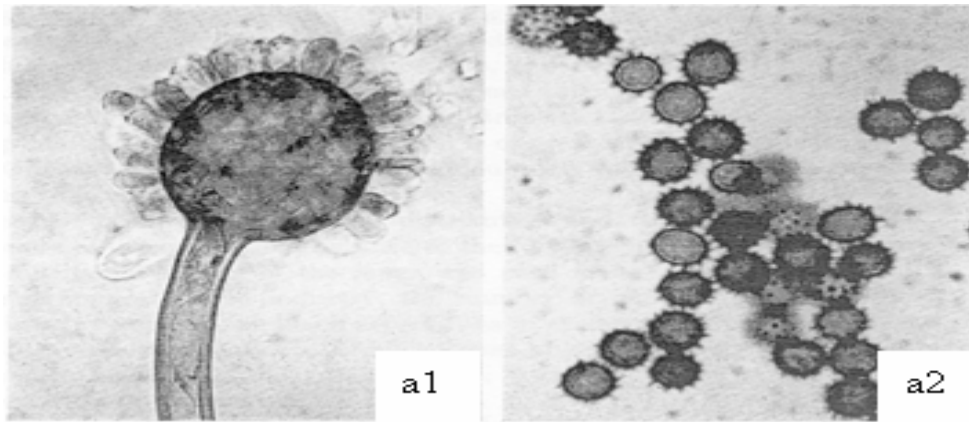


Figure 6: *A. japonicus*, a1, tête avec des stérigmates courtes unisériées, (x 740). a2, conidies fortement echinulées, (x 1720).

- **Bisiriés**

Le sous groupe des bisiriés comprend l'espèce *A. carbonarius* et un ensemble d'espèce appelé *A. niger* aggrégats.

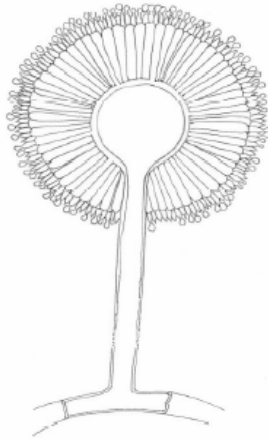


Figure 7 : Conidiophore aspergillaire bisérié (Abarca et al., 2004)

A. carbonarius: C'est l'espèce la plus distincte au sein de la section *Nigri* (Abarca et al., 2004). Cette distinction est à la fois phénotypique (Raper et Fennell, 1965 ; Kevei et al., 1996) biochimique (Kevei et al., 1996) et moléculaire (Kusters-van Someren et al., 1991; Mégnégneau et al., 1993; Pařenicová et al., 1997, 2000, 2001; Varga et al., 2000, 2003). Au sein de l'espèce *A. carbonarius* une seule variété a été proposée, il s'agit : d'*A. carbonarius* var. *incidus* (Hamari et al., 1999, Varga et al., 2000).

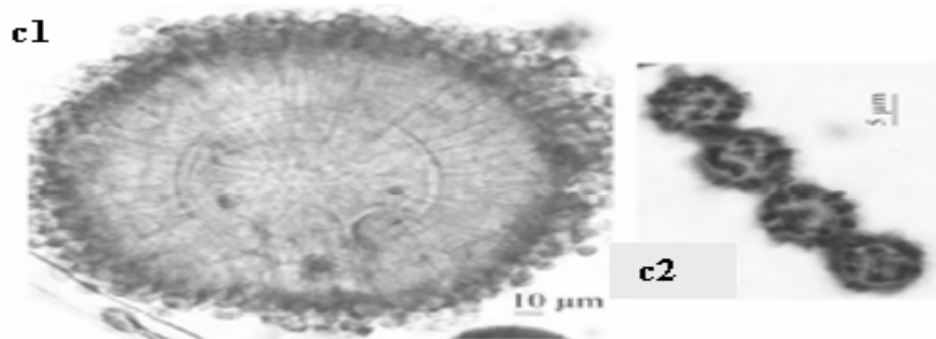


Figure 8: *A. carbonarius* (A-1157, UAB Mycology group), tête (c1) et conidies (c2) (Abarca et al., 2004)

A. niger agrégats: Ce groupe a été constitué par Al-Musallam en 1980. Certains de ces représentants : *A. niger* Tiegh, *A. tubingensis* Mosseray et *A. foetidus* Raper et Fennell: ont été libellé GRAS par la FAD aux Etats Unis (Food and Drug Administration) et sont utilisés en tant qu'outils biotechnologiques en industrie (Pařenicová *et al.*, 1997). Des études récentes (Abarca *et al.*, 1994), ont montré pour la première fois que ce groupe est hétérogène et pourrait dissimuler quelques spécimens ochratoxinogènes potentiellement dangereux pour une utilisation comme GRAS. Une attention particulière s'est alors focalisée sur ce groupe afin de mieux clarifier sa taxonomie et différencier ses représentants. Différencier les espèces ochratoxinogènes de celles qui ne le sont pas au sein de ce groupe est l'objectif principal à satisfaire. Ce complexe pourrait renfermer selon les différents avis taxonomiques 2 taxons (*A. foetidus* et *A. niger* (Al-Musallam, 1980)), 3 taxons (*A. acidus*, *A. citricus* et *A. niger* (Kozakiewicz, 1989)) ou 4 taxons (Pařenicová *et al.*, 2001) (*A. niger*, *A. tubingensis*) (Kusters van Someren *et al.*, 1991), (*A. brasiliensis*) (varga *et al.*, 1994) et (*A. foetidus*) (Pařenicová *et al.*, 1997)).

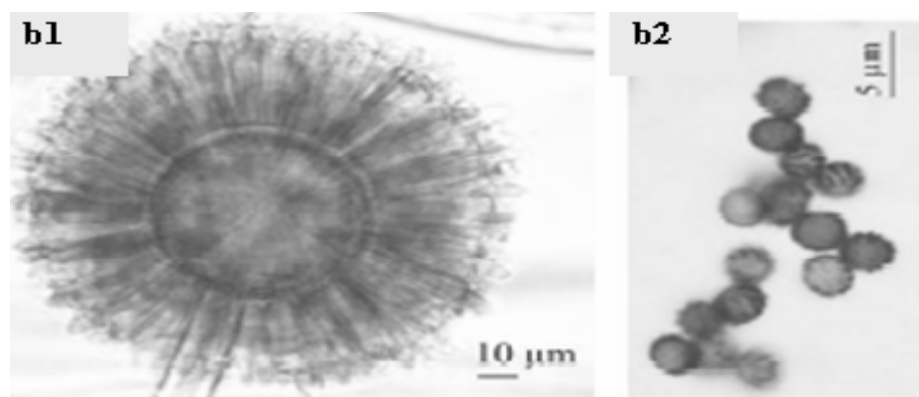


Figure 9 : *A. niger* agrégats (A-219, UAB Mycology group), tête (b1) et conidie (b2) (Abarca *et al.*, 2004)

• Les espèces non communes

Elles sont au nombre de 3 : *A. helicothrix*, *A. ellipticus* et *A. heteromorphus*. Pour reconnaître de façon globale les grands groupes des black aspergilli, Abarca *et al.*, (2004) propose la clef d'identification suivante en excluant les formes non communes:

Aspergilli unisiriés	<i>A. japonicus</i> et <i>A. aculeatus</i> confondus
Aspergilli bisiriés	
▪ Si le diamètre des conidies est > 6 µm	<i>A. carbonarius</i>
▪ Si le diamètre des conidies est < 6 µm	<i>A. niger aggregate</i>

D'après Samson et al., 2004, 15 espèces dont 5 récemment découvertes (*A. vadensis* (De vries et al., 2004 a, b) *A. costaricaensis*, *A. lactocoffeatus*, *A. piperis*, *A. sclerotioniger* (Samson et al., 2004)) peuvent être recensées et certains critères morphologiques distinctifs des champignons, surtout ceux rapportés ochratoxinogènes, (cutivés sur Czapek yeast extract agar (CYA) et incubés à 25°C pendant 7 jours) (Pitt et Hocking, 1997 ; samson et al., 2004) peuvent être retenus (tableau 5).

Tableau 5 : Caractéristiques morphologiques au sein de la section Nigri

Espèces (Samson et al., 2004)	Tête conidienne	Présence de sclérotés	Diamètre des conidies (µm)	Formes et ornementation des conidies
<i>A. aculeatus</i> <i>A. japonicus</i>	Unisiriée	(+)§ (blancs à crèmes atteignant 500 µm) (Botton et al., 1990)	< 6 (4-5)	Très ellipsoïdales Globuleuses, échinulées
<i>A. carbonarius</i> *		(+) (jaune grisâtre)	> 6 (7-9)	Verruqueuses
<i>A. ellipticus</i>	Bisériée	(+)§	< 6 (parfois > 6)	Très ellipsoïdales
<i>A. niger</i> * (type N)		(-)	< 6 (3.5-5)	Sphériques, globuleuses, brunes, échinulées
<i>A. tubingensis</i> (type T)		(+)§		
<i>A. foetidus</i> *		(-)	< 6	
<i>A. brasiliensis</i>		(-)	< 6	
<i>A. heteromorphus</i>		(-)	< 6	
<i>A. homomorphus</i>		(-)	<6	
<i>A. costaricaensis</i>		(+)	3.5-4.3	Gobuleuse ou sub-globuleuses - Lisse quand elles sont jeunes - De paroi rugueuse et couleur brun foncé (mature)
<i>A. lactocoffeatus</i> *		(-)	3.5-4.1 x 3.4-3.9	Subglobuleuse Très souvent lisses
<i>A. piperis</i>		(+) (du jaune ou brun rosâtre)	2.8-3.6 x 2.8-3.4	Lisses (jeunes) Très dure avec des striations et des bars irréguliers
<i>A. sclerotioniger</i> *	(+) (jaune orange)	5-6 x 4.9-5.6	Subglobuleuse Lisses (jeunes) Verruqueuses et brun foncé	
<i>A. vadensis</i> (De vries et al., 2004 a, b)	(-)	< 6		

* espèce productrice d'OTA confirmée ; § caractère pas toujours présents

b- *Aspergillus flavi* et la production des aflatoxines:

Trois souches de cette section sont principalement connues pour leur capacité à synthétiser des aflatoxines. *A. flavus* produit principalement l'aflatoxine B₁ et l'aflatoxine B₂ alors qu'il ne produit habituellement ni l'aflatoxine G₁ ni l'aflatoxine G₂, bien que quelques rares exceptions aient été décrites (Wicklow et Shotwell, 1983 ; Gabal *et al.*, 1987). *A. parasiticus*, produit les 4 aflatoxines (B₁, B₂, G₁ et G₂) (Dorner *et al.*, 1984). Enfin, *A. nomius*, une souche rare très proche d'*A. flavus*, est capable de produire certaines aflatoxines (Kurtzman *et al.*, 1987).

Les espèces de cette section sont capables de se développer à des températures comprises entre 10 et 48°C avec une température optimale de 33°C (Domsch *et al.*, 1980). Ces champignons peuvent se développer dans un milieu présentant une activité de l'eau (Aw) située entre 0.78 et 0.80 avec un pH allant de 2.1 à 11.2 (Ayerst, 1969 ; Olutiola, 1976). Ils sont donc plus présents dans les régions tempérées chaudes comme les régions tropicales et sub-tropicales.

La taxonomie de ces espèces est compliquée de part la grande similarité qui existe entre elles et vu l'instabilité des différents caractères morphologiques qui caractérisent chacune d'elle. Donc, morphologiquement, il est presque impossible de distinguer les différentes espèces appartenant à la section *flavi*, c'est pourquoi la différenciation se base parfois sur le groupe d'aflatoxine produit, vu que *A. flavus* produit les aflatoxines du groupe B alors que *A. parasiticus* produit les 2 groupes d'aflatoxines B et G. Différentes études récentes utilisant les techniques de la biologie moléculaire tel que la (PCR, RFLP, AFLP, RAPD...) n'ont pas permis de trancher d'une façon définitive la différenciation entre ces espèces.

b.1 *A. flavus* (Pitt et Hocking, 1997) : Cette espèce se caractérise par un thalle vert jaune à vert olive, floconneux, plus dense vers le centre, lâche en périphérie. Des colonies granuleuses sur Malt Agar (MA) montrant un revers incolore à beige clair, fertile sur toute la surface alors que sur milieu *Aspergillus flavus parasiticus* Agar (AFPA), un revers orange caractéristique est observé. Les têtes aspergillaires ont une vésicule hémisphérique (25 à 60µm de diamètre). Ces têtes sont uni ou bisériées, selon leur degré de maturation radiées, de couleur vert jaune à vert olive. La vésicule est sphérique entièrement recouverte ou au trois quart, donnant des phialides verdâtres, de dimensions (6-10 µm x 4-5.5µm) à disposition radiaire ou en colonne. Les conidies gris pâle sont subsphériques à ellipsoïdales, échinulées et mesurent 3 à 4.5µm de

diamètre. Les conidiophores sont longs (jusqu'à 1mm de longueur) et les plus âgés sont rugueux. Les sclérotes sont souvent produits chez les isollements jeunes, de taille et de forme variables, souvent brunes à noires.

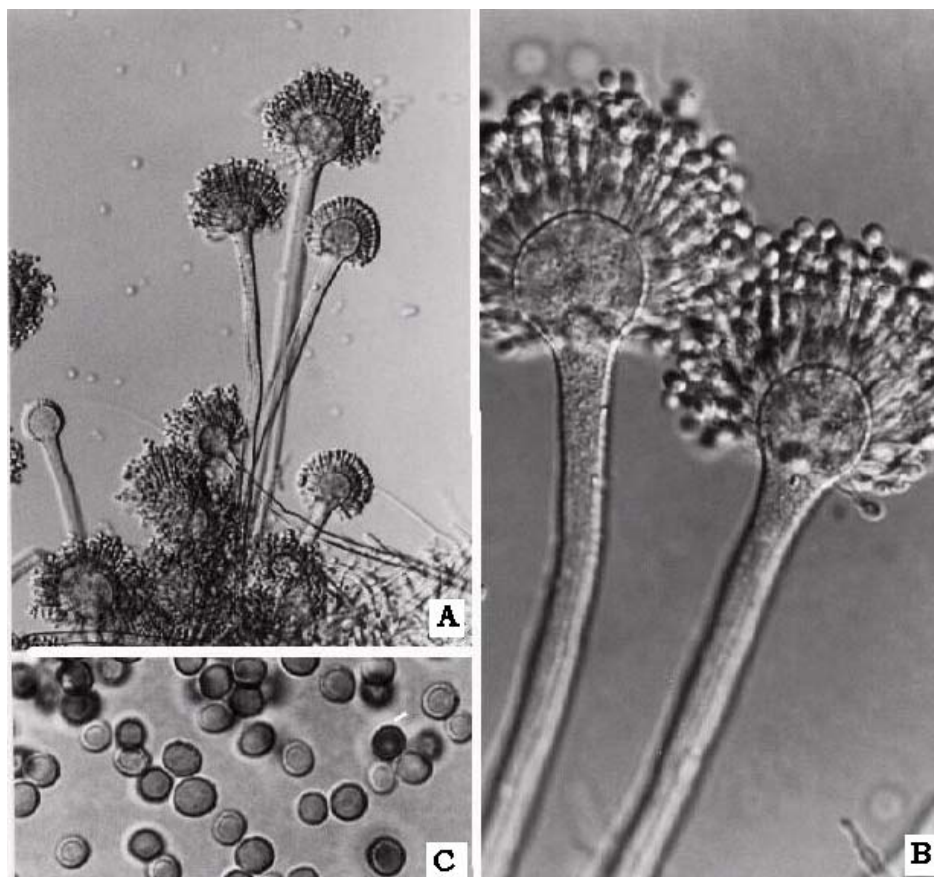


Figure 10 : *A.flavus*, A : Conidiophores 250X, B : Conidiophores 900X, C : Conidies 1470X

Les mycotoxines produites par cette espèce sont l'AFB1, l'AFB2, l'acide aspergillique, l'acide Kojique, l'acide cyclopiazonic (CPA) et l'acide 3-nitropiopianique.

b.2 *A. parasiticus* (pitt et Hocking, 1997) : Cette espèce se caractérise par un thalle vert jaune sombre, floconneux et des colonies granuleuses et denses sur Malt Agar (MA), au revers incolore à beige clair. Le conidiophore de taille de 250-500µm de couleur marron pâle à paroi échinulée. Les têtes aspergillaires sont majoritairement unisériées caractérisées par des vésicules sphériques de 30-35 µm de diamètre recouverte au trois quart, donnant des phialides verdâtres de 7-11µm portant des conidies sphériques de 4-6µm de diamètre à

disposition radiaire ce qui la diffère parfois d'*A. flavus* caractérisée par des conidies plus petites. Les sclérotés occasionnellement produits chez les isollements jeunes, sphériques de 400-800µm de diamètre sont souvent blanches au début et deviennent noirs avec le temps. Les mycotoxines produites par cette espèce sont les AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2.

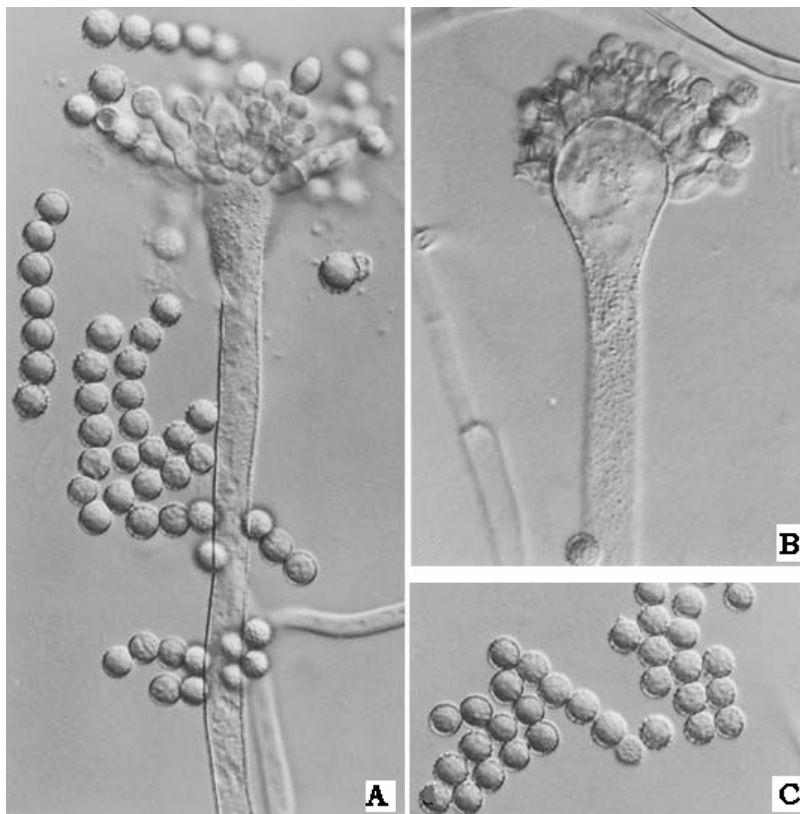


Figure 11 : *A. parasiticus*, A et B : Conidiophores 900X, C : Conidies 1470X

Le tableau 6 résume certaines caractéristiques morphologiques des espèces aflatoxinogènes appartenant à la section flavi (Pitt et Hocking, 1997).

Tableau 6 : Cractéristiques morphologiques d'*A.flavus* et *A. parasiticus*

Espèces	Tête conidienne	Présence de sclérotés	Diamètre des conidies (µm)	Formes et ornementation des conidies	Conidiophore
<i>A. flavus</i>	Unisériée et bisériée	Production par certains isolats	3.5-4.5µm	Globuleuses Echinulées	400-1000µm à paroi échinulée
<i>A. parasiticus</i>	Unisériée	Occasionnellement	4-6µm	Sphériques	250-500µm à paroi échinulée

La section *flavi* s'avère très importante vu la diversité des denrées alimentaires qu'elle peut contaminer. Les aflatoxines produites par les *Aspergillus* de la section *flavi* sont généralement trouvées dans des nourritures en provenance de régions chaudes et humides; elles ont été détectées dans les céréales, les produits à base de noix comestibles et de leurs dérivés (arachides, noix du Brésil, pistaches, amandes, noix, noix de pécan, noisettes), les graines d'oléagineux (coton, copra) et les produits qui en sont dérivés, les fruits secs, les figues et dans le lait.

I-7.2. Le genre *Penicillium* (Pitt, 1987) :

a- Définition

Ce genre contamine divers substrats organiques notamment les céréales, les arachides, les produits laitiers. C'est aussi un contaminant de laboratoire. Il a des caractéristiques proches que celles du genre *Aspergillus*, il est saprophyte et peut devenir parasite en présence d'humidité lors du stockage.

Ses espèces produisent un certain nombre de mycotoxines telles que la patuline, l'acide pénicillique, la citrinine, la roquefortine C, la toxine PR, l'isofumigaclavine et l'acide mycophénolique et l'Ochratoxine A.

Le genre *Penicillium* comprend près de 150 espèces, il est aussi largement présent dans le sol. Ce sont des micro-organismes simplement saprophytes considérés comme agents de contamination des denrées alimentaires ou utilisés comme agents de synthèse ou de fermentation et comme producteurs d'antibiotiques (Pénicilline, griséofulvine).

b- Caractéristiques morphologiques :

Ces champignons présentent un thalle vert ou plus rarement blanc dont la texture est souvent utilisée comme critère de différenciation.

Les conidiophores sont isolés ou groupés en faisceaux, hyalins, lisses ou granuleux, simples ou ramifiés et terminés par un pénicille.

Les pénicilles sont constitués soit :

- d'un simple verticille de phialides : monoverticillé,
- d'un verticille de métules portant les phialides : biverticillé,
- de plusieurs verticilles successifs comportant des ramifications, de métules et des phialides : triverticillé, quadrivericillé...

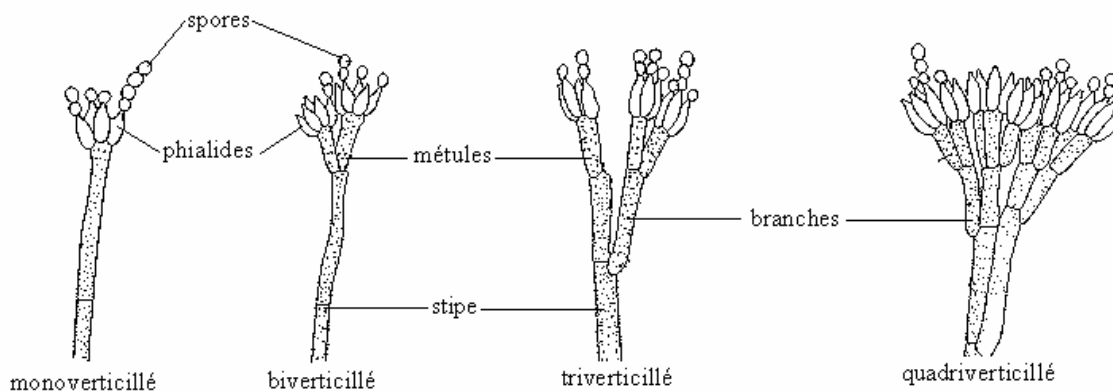


Figure 12: *Penicillium* mono, bi, tri et quadrivericillé

Les phialides sont ampulliformes ou lancéolées. Les conidies peuvent être disposées en longues chaînes, globuleuses, elliptiques, cylindriques, fusiformes, lisses ou rugueuses, hyalines ou de couleur grises ou verdâtres. Dans certaines espèces, on rencontre des sclérotés, qui correspondent à la forme sexuée du champignon (Bouchet *et al.*, 1989).

c- *Penicillium verrucosum* l'espèce ochratoxinogène :

c.1 Définition :

P. verrucosum est un Deutéromycète, de la classe des Hyphomycètes. Il appartient à l'ordre des *Moniliales*, et rejoint la famille des *Moniliaceae*. Il rentre dans le sous-groupe des *Penicillium*.

c.2 Description morphologique :

La morphologie de ce champignon est influencée par le milieu de culture :

- colonies sur milieu CYA (fig 13) : 28-32 mm de diamètre, le mycélium est de texture veloutée à granuleuse ou moins souvent floconneuse. On observe la présence de sillons radiaux peu profonds et un amas central. Les sillons sont nombreux à la

périphérie. La marge est blanche, étroite (1-2mm) et fine. La conidiogénèse est modérée à forte, jaune-vert. Il y a une production d'exsudat jaune pâle, marron pâle ou rose pâle. Des pigments solubles sont parfois produits : orange ou marron-rouge. Le revers est orange-brun pâle.



Figure 13 : Colonie de *P. Verrucosum* après 7 jours sur milieu CYA

- colonies sur milieu MEA (fig 14) : 25-30 mm de diamètre, le mycélium est lisse, dans certains cas il y a présence de sillons radiaux espacés à modérément dense. La texture est veloutée, floconneuse au centre avec une marge translucide. Le mycélium est blanc ou marron. La conidiogénèse est modérée, jaune-vert similaire au CYA, avec absence de pigments solubles ou d'exsudat. Le revers est similaire à celui sur CYA ou quelques fois jaune brun.



Figure 14: *P.verrucosum* après 7 jours sur milieu MEA

c.3 Caractères microscopiques et macroscopiques générales :

Le thalle est à croissance généralement rapide. Il est presque velouté de couleur vert-bleu à vert-gris sur milieu CYA. Le revers est incolore, rosâtre, jaune vif ou brun pourpre en fonction des milieux. Il a une forte odeur de terre ou de moisi. L'appareil sporifère est terverticillé, à paroi rugueuse. Les phialides sont ampulliformes à col et les conidies sont sphériques à ellipsoïdales avec une paroi lisse ou légèrement rugueuse, portée en chaîne irrégulière (fig 15).

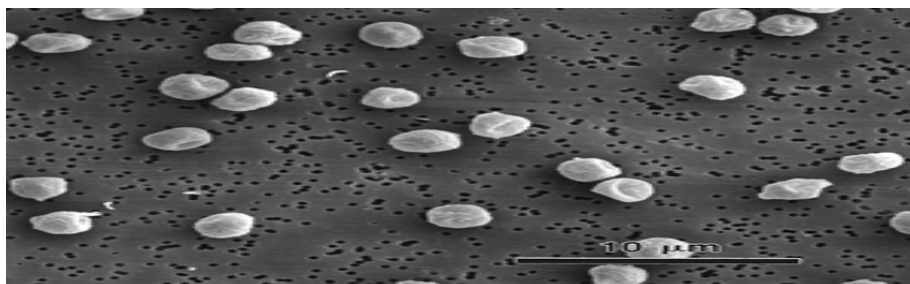


Figure 15: Conidies de *P. Verrucosum* 1400X

P. verrucosum est une espèce ubiquiste. Elle se développe sur de nombreux substrats organiques, notamment les céréales et les produits laitiers. Ce champignon est le principal producteur d'OTA en climat tempéré. Il pousse entre 0 et 30°C avec une température optimale de 20°C. Le pH optimal se situe entre 6 et 7 mais il peut croître avec une activité de l'eau (A_w) de 0.80. Toutefois, on peut retrouver un taux significatif d'OTA à 4°C et avec une (A_w) > 0.86 (Sweeney et Dobson, 1998).

I-8.Détection, identification et quantification des champignons mycotoxinogènes par méthodes moléculaires

Des progrès ont été accomplis depuis les 10 dernières années dans la détection, l'identification et la quantification moléculaires des champignons mycotoxinogènes. Les méthodes développées dans la littérature sont basées soit sur la détection par PCR (Polymerase Chain Reaction) ou par PCR multiplex de certaines espèces productrices de mycotoxines, ou bien sur la quantification de ces espèces par PCR semi quantitative ou par PCR quantitative en temps réel.

a- Principe de la PCR

L'amplification enzymatique de l'ADN *in vitro* par PCR est l'une des techniques récentes qui est hautement sensible et spécifique. La PCR est une méthode simple composée de trois étapes (**Saiki et al., 1985**): 1) l'ADN est dénaturé à température élevée (94°C à 96°C) pour convertir l'ADN à double brins en un à ADN simple brin; 2) La température est ensuite diminuée (au T_m optimale des amorces) afin de permettre aux amorces de s'hybrider à leur site complémentaire sur la séquence cible de l'ADN; 3) L'ADN est allongé sous l'action d'une ADN polymérase thermophilique par l'addition de nucléotides libres pour créer à partir de chacune des amorces une copie de l'ADN initial. La répétition de ce processus cyclique de 30 à 35 fois résulte en l'augmentation exponentielle des quantités d'ADN de départ (2^n , n = nombre de cycles). L'avantage majeur de la PCR est de permettre la détection d'une simple molécule d'ADN à partir d'un mélange complexe d'ADN (**Henson et French, 1993**).

I-8.1 Les régions d'ADN cibles pour la détection et la quantification moléculaire des champignons mycotoxinogènes

Toute séquence d'ADN qui est spécifique à une espèce particulière ou à un groupe d'espèces peut être utilisée pour la détection par PCR (Henson et French, 1993). Elles codent pour un ARNr (nucléaire et mitochondrial) ou pour la mycotoxine.

a- L'ADN ribosomal nucléaire et mitochondrial

L'une des premières applications de la PCR dans la mycologie a été réalisée par White *et al.*, (1990) concernant l'amplification et le séquençage de l'ADN ribosomal fongique pour établir une relation taxonomique et phylogénétique. Les séquences de l'ADN ribosomal contiennent des régions conservées et variables, leur évolution permet d'étudier l'évolution du génome d'un organisme.

Les (ADNr) nucléaires codent pour les gènes des (ARNr) constitutifs impliqués entre autres dans le bon positionnement des ARNr pour leur traduction en protéine (Lewin, 1994). On trouve tout d'abord l'espaceur transcrit externe en 5' (5'ETS) puis les deux espaceurs transcrits internes (ITS1 et ITS2), localisés respectivement entre 18S et 5,8S et entre 5,8S et 28S, et enfin l'espaceur transcrit externe en 3' (3'ETS). Organisés en tandem, les gènes ribosomiques

possèdent tous la même orientation. Ces gènes sont séparés par des espaceurs intergéniques non transcrits ou IGS (InterGenic Sequence) (Figure 16).

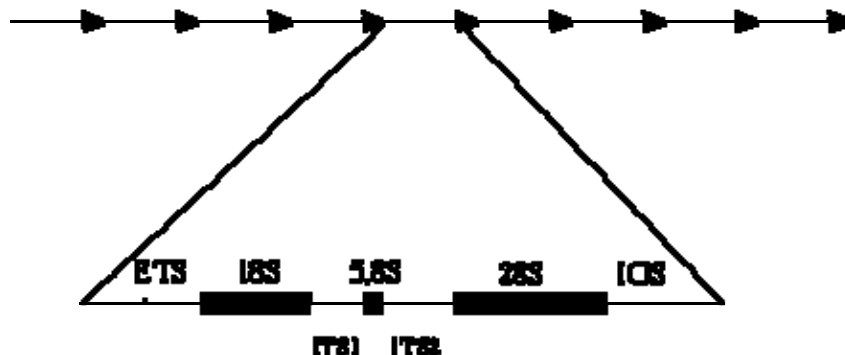


Figure 16 : Organisation des gènes ribosomiques chez les champignons

De grandes variations génétiques sont trouvées dans les parties non codantes, ITS et IGS ce qui permet leur utilisation dans les études de population et les études phylogénétiques des champignons filamenteux (Henry *et al.*, 2000; Mirete *et al.*, 2003, 2004; Parenicova *et al.*, 2001; Varga *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2001). En plus, les ITS et les IGS sont largement utilisés pour la fabrication des amorces spécifiques permettant de différencier les espèces mycotoxinogènes appartenant aux genres *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium* (Llorens *et al.*, 2006 ; Gonzalez-Jaen *et al.*, 2004; Patino *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2001, Patino *et al.*, 2005 ; Pedersen *et al.*, 1997). D'autres séquences de l'ADNr comme 18S (ADNr), 28S (ADNr) et l'ADNr mitochondrial sont aussi utilisés pour la fabrication des amorces spécifiques (Edel, 1998).

b- Séquences des fragments obtenus par AFLP, RFLP, RAPD

La RAPD de l'anglais "Random Amplified Polymorphisms DNA" dérive de la PCR par l'emploi de courtes amorces (6 à 10 mers) aléatoires (Williams *et al.*, 1991). Cette technique permet d'obtenir des polymorphismes de fragments aléatoires à partir de l'ADN nucléaire. L'emploi de la RAPD permet de faire des distinctions au niveau des populations et à l'intérieur des espèces, mais demande au préalable l'isolement du champignon.

Une autre approche utilisée est les empreintes génétiques de l'ADN génomique à l'aide d'analyse AFLP (Amplified fragment-length polymorphism). La réalisation de cette technique nécessite tout d'abord la digestion de l'ADN fongique par des enzymes de restriction et la

ligation des adaptateurs oligonucléotidiques sur les extrémités des fragments de restriction. Ensuite une PCR sélective est réalisée en utilisant des amorces complémentaires aux adaptateurs et aux sites de restriction. Sur gel d'acrylamide, plusieurs dizaines de fragments (généralement entre 500 pb et 1000 pb) peuvent donc être visualisés en une seule PCR suivie d'un seul gel sans connaissance préalable des séquences nucléotidiques. Cette technique, avec le RAPD, sont largement utilisées pour la classification et la caractérisation moléculaire des champignons mycotoxinogènes (Varga *et al.*, 1993 ; Frisvad *et al.*, 2005 ; Perrone *et al.*, 2006). Une autre technique de marquage moléculaire utilisée est le RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) qui consiste à couper l'ADN en morceaux, à l'aide d'enzymes de restriction, de chaque côté de la région polymorphique laissant celle-ci intacte. Les fragments d'ADN sont alors séparés par électrophorèse sur gel, transférés par capillarité sur une membrane. Des sondes (fragment d'ADN marqué) capables de reconnaître spécifiquement le polymorphisme d'intérêt sont ensuite utilisées pour visualiser les fragments d'ADN complémentaires. Quoique très efficace et fiable cette technique est souvent tenue en échec lorsque la quantité d'ADN disponible pour les analyses est très faible ou lorsque l'ADN est trop endommagé.

Ces approches nécessitent toutefois l'isolement des champignons et l'extraction d'ADN en grande quantité (Mills *et al.*, 1992; Pryor *et al.*, 1994; Wiglesworth *et al.*, 1994; Lanfranco *et al.*, 1995). Ces contraintes rendent difficiles leur utilisation à des fins de diagnostic routinier pour détecter les champignons dans les matrices alimentaires. Pour cela des fragments obtenus par le RAPD ou AEFLP (marqueur moléculaire) sont séquencés puis ces SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) ont été utilisées pour construire des amorces spécifiques permettant l'identification des champignons à une espèce (Pelegrielli Fungaro *et al.*, (2004) et Schmidt *et al.*, (2004) pour la détection d'*A. carbonarius* ; Moeller *et al.*, (1999) pour la détection de *F. moniliforme* et *F. subglutinans*) ou à un groupe d'espèce (Schilling *et al.*, 1996 pour la détection des espèces de *Fusarium*)

c- Les régions d'ADN codant pour des mycotoxines

La troisième stratégie est de construire des amorces à partir d'une séquence d'un gène bien caractérisé. Pour la détection des champignons mycotoxinogènes, les gènes de la voie de biosynthèse des mycotoxines sont visés. Actuellement, les « gènes organisés en cluster » impliqués dans la biosynthèse des trois groupes des mycotoxines: aflatoxines (et leur

intermédiaire stérigmatocystine), trichothecène et fumonisines ont été caractérisés (Russell et Paterson, 2006). En plus, certains gènes de PKS des autres mycotoxines comme l'OTA, la patuline et la zéaralénone ont été identifiés.

Des amorces construites à partir des séquences des gènes PKS ont été fabriquées pour détecter les champignons producteurs des aflatoxines (Shapira *et al.*, 1996; Geisen 1996), des trichothecène (Niessen et Vogel 1998; Schnerr *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001; Bluhm *et al.*, 2002), des producteurs des fumonisines (Bluhm *et al.*, 2002; Gonzalez Jaen *et al.*, 2004) et aussi pour les producteur de la patuline (Paterson *et al.*, 2000).

Récemment le gène de PKS responsable de la production d'OTA a été identifié chez *A. ochraceus* (O'Callaghan *et al.*, 2003) et *P. nordicum* (Geisen *et al.*, 2004). En plus, ces deux gènes sont différents entre eux. Une amorce universelle permettant de détecter les champignons producteurs d'OTA n'est pas encore établie. Or, les méthodes de détection par PCR décrites dans la littérature sont spécifiques pour une espèce productrice d'OTA. Récemment, Dao *et al.*, (2005) ont fabriqué une amorce permettant de détecter à la fois les champignons producteurs d'OTA et de citrinine.

Ecotoxigénèse

Les mycotoxines peuvent être produites à tous les stades de la chaîne alimentaire depuis le champ jusqu'au produit fini (Pfohl-Leskowicz, 1999). Elles peuvent survenir au champ (avant récolte), lors du transport, pendant le stockage ou au cours de la transformation. La mycotoxine peut aussi être présente alors que l'agent responsable a disparu, soit du fait de l'évolution de la mycoflore, soit du fait de traitements technologiques. Trois principaux facteurs interviennent à la colonisation fongique et par suite à la contamination des aliments par les mycotoxines. Ces facteurs sont d'ordres physiques, chimiques et biologiques (Mitchell *et al.*, 2004).

I-9. Facteurs physiques

Ils constituent l'ensemble des conditions environnementales comme la température, la disponibilité en eau, l'infestation par les insectes et l'attaque par les rongeurs. En général, les conditions favorisant la toxigénèse sont plus restrictives que celles permettant la croissance des moisissures.

I-9.1. La température :

La température joue un rôle prépondérant sur la croissance et la physiologie des moisissures et, en outre sur la compétition entre les espèces. Compte tenu des températures habituellement rencontrées dans les denrées alimentaires, comprises généralement entre 0 °C et 35°C, et dans la mesure où les autres facteurs de l'environnement ne jouent pas de rôle limitant, des moisissures sont susceptibles de s'y développer. La plupart des champignons sont mésophiles avec des optima de croissance variant de 25 °C à 35°C (Berthier *et al.*, 1993).

En général, la température optimale de croissance pour la plupart des champignons se situe vers 25°C (Botton *et al.*, 1990). C'est le cas des champignons du genre *Aspergillus* dont l'intervalle de croissance correspond à une température allant de 12 °C à 39 °C avec un optimum se fixant à 24°C. D'autre part, certaines espèces de champignons sont psychrophiles ou psychrotolérantes et sont capables de se développer à des températures relativement basses comme les champignons du genre *Penicillium* dont l'intervalle de température varie de 4 °C à 31 °C avec un optimum vers 12°C.

La température permettant une toxigénèse optimale est en général voisine de la température optimale de croissance, pour la plupart des mycotoxines ; tout en demeurant légèrement inférieure (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Il en est ainsi pour la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus*. La patuline, l'acide pénicillique et l'OTA sont élaborées à des températures généralement inférieures à celle de la croissance (Samson, 1991). Pour d'autres toxines, telles que la Zéaralénone élaborée par *Fusarium roseum*, la température optimale de toxigénèse peut être jusqu'à 15 °C inférieure à celle de la croissance. Parfois, l'apparition de mycotoxine dans les conditions naturelles est favorisée par des températures relativement basses, au voisinage de la température minimale de croissance : de l'ordre de 1°C à 4°C pour les trichothécènes produites par *Fusarium tricinctum*.

En ce qui concerne les *Aspergillus* de la section *Nigri*, de façon générale, la production d'OTA se fait dans un très large intervalle de température ce qui explique que cette molécule peut être produite de façon continue au niveau du vignoble (Esteben *et al.*, 2004).

La température intervient aussi sur l'accumulation de toxines par son effet directe sur leur stabilité dans les aliments, cet effet est tout particulièrement important pour les toxines peu thermostables à la température (acide pénicillique, patuline, citrinine).

I-9.2 Activité de l'eau (Aw) :

Il s'agit d'un paramètre dont l'influence est déterminante sur le développement des moisissures ainsi que sur la production de mycotoxines. Dans un premier temps ce paramètre influence la germination des spores ; puis dans un second temps, le développement mycélien. Quelle que soit la nature de l'aliment aucun micro-organisme ne peut se développer lorsque l'(Aw) est inférieure à 0.65.

Pour les *Aspergilli*, la croissance optimale selon les espèces se situe entre une (Aw) de 0.71 et une Aw de 0.98 alors que la plupart des *Penicillia* se développent à des (Aw) comprises entre 0.78 et 0.88 (tableau 7).

Tableau 7 : Activité de l'eau optimale pour la croissance de certaines espèces de champignons *Aspergillus* sp. et *Penicillium* sp. (Belli et al., 2004 ; Adebajo et al., 1994., Pitt et Hocking, 1977).

champignons	A_w minimale	A_w maximale
<i>Aspergillus carbonarius</i>	0.88	0.98
<i>Aspergillus niger</i>	0.90	0.98
<i>Aspergillus japonicus</i>	0.90	0.98
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.83	0.87
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0.82	0.98
<i>Penicillium cyclopyium</i>	0.82	0.86
<i>Penicillium viridicatum</i>	0.83	0.86
<i>Penicillium flavus</i>	0.84	0.99

Parmi les multiples interactions entre la température et les autres facteurs, le couple « température-humidité » revêt une importance particulière dans la croissance des champignons et par suite dans la production des mycotoxines. La figure 17 illustre un exemple de l'interaction (T°C-A_w) dans le cas des *Aspergillus* de la section *nigri*.

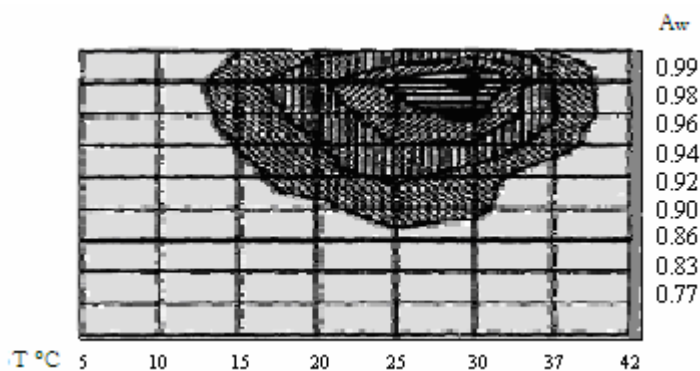


Figure 17 : Effet de la température et l'activité de l'eau sur le développement des champignons du genre *Aspergillus nigri* (Commission Européenne, troisième forum d'OTA, brussel, Janvier 2004).

I-10. Facteurs chimiques

I-10.1 Composition gazeuse :

La plupart des moisissures sont aérobies. La réduction de la pression partielle en oxygène et surtout l'accroissement de la teneur en CO₂ ont un effet dépresseur important sur la toxigénèse (Derache, 1986). La production d'aflatoxines dans l'arachide, est modérément réduite entre 21 et 5% d'O₂. Elle est pratiquement inhibée lorsque la proportion en O₂ est

inférieure à 1%. L'augmentation de la teneur en CO₂ (20%), provoque une chute importante de la production d'aflatoxines. De même la production de la patuline et d'acide pénicillique est réduite par des basses concentrations d'oxygène tandis que la croissance des souches toxigènes n'est pas affectée. Toutefois, après conservation dans une atmosphère confinée, dans laquelle les moisissures peuvent plus ou moins se développer, la remise à l'air libre ou la ventilation provoque rapidement une intense toxino-génèse (Le Bars et Le Bars, 1987).

I-10.2 Traitements agricoles :

Plusieurs facteurs additionnels peuvent influencer la production des mycotoxines dans le champ. Ils peuvent s'agir des pratiques agricoles comme le labourage et la rotation de récolte (Lipps et Deep 1991), les fongicides utilisés (Moss et Frank, 1985), la variété de la plante (Golinski *et al.*, 1996) et les différences géographiques (Langseth *et al.*, 1995). En outre la culture biologique peut poser un risque pour la production accrue de mycotoxine comme cela a été proposé par Edwards (2003).

I-10.3 Nature du substrat :

La toxigénèse dépend beaucoup plus étroitement que la croissance de la composition chimique de la denrée sur laquelle les moisissures se développent. Sur une denrée alimentaire, on trouve souvent une espèce dominante et donc ses toxines. Par exemple, *Penicillium verrucosum* est le producteur principal d'OTA dans les céréales tandis que *Penicillium nordicum* contamine souvent les produits riches en protéines, produits fermentés à base de viande, ou de fromage (Lund et Frisvard, 2003).

Cependant en général, la biogénèse des aflatoxines, de l'OTA, de la stérigmatocystine et de l'acide pénicillique, est favorisée tout d'abord par la présence de glucides dans le substrat, puis de lipides et enfin la présence de protéides qui ont une moindre influence.

Le raisin à maturité présentant le maximum de glucides (glucose et fructose) a été en effet décrit comme étant un substrat idéal pour le développement des champignons ochratoxinogènes et pour la production de l'OTA, comparé à ce même substrat à des stades antérieurs de maturité. L'acidité est aussi une des propriétés du substrat qui joue un rôle important dans le développement fongique et la toxino-génèse.

I-11. Facteurs biologiques

Ils sont fondés sur les interactions entre la colonisation de l'espèce fongique toxino-gène et le substrat.

Les facteurs biologiques peuvent être liés à l'espèce fongique, à la spécificité de la souche et à l'instabilité des propriétés toxiques. Une même toxine peut être élaborée par différentes espèces quelque fois appartenant à différents genres, par exemple l'OTA ou la patuline qui sont produites par différentes espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* ; et une même espèce peut produire plusieurs mycotoxines (par exemple OTA et citrinine par *Penicillium verrucosum* ; OTA et acide pénicillique pour *Aspergillus ochraceus* ; citrinine et patuline pour *Penicillium claviforme* ou *Aspergillus terreus*) (le Bars, 1988).

D'autres facteurs d'ordre biologique s'avèrent aussi très importants, il s'agit des insectes et des acariens qui sont des vecteurs de spores de moisissures qu'ils introduisent à l'intérieur même du grain par les lésions qu'ils créent. La contamination d'arachides, de coton, de maïs par *Aspergillus flavus* produisant l'AFB1 avant la récolte est souvent liée à l'attaque par les insectes. Durant le stockage, les échantillons de grain hébergeant des charançons révèlent en général une population fongique importante et parfois des mycotoxines (AFB1, OTA, citrinine dans le maïs ou l'orge).

Et enfin, la présence de plusieurs espèces fongiques sur la même denrée a généralement un effet dépressif sur la production de toxine. Cela s'explique d'une part, par la compétition pour le substrat et d'autre part, par le fait que certaines souches peuvent dégrader la toxine. Bouraima *et al.* (1993) ont rapporté une compétition entre *A. flavus* et *A. ochraceus*. La présence de ces deux champignons conduit essentiellement vers la production de l'aflatoxine, les ochratoxines sont très peu produites ou totalement absentes. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que dans la biogénèse des aflatoxines, *A. flavus* utilise la phénylalanine du support sur lequel il se développe. Lorsqu'il est plus abondant, il détournerait à son profit toute la phénylalanine ; l'OTA, un analogue de la phénylalanine ne pourrait alors être produite.

Contamination Alimentaire

I-12. Origine des mycotoxines et produits contaminés

Les mycotoxines sont produites par 5 genres de champignons : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria* (Miller et Trenholm, 1994). Plusieurs sortes de mycotoxines peuvent se retrouver dans les denrées alimentaires (tableau 1), seules certaines contaminent l'alimentation humaine et présentent des effets toxiques pour la santé humaine. Les plus importantes sont : les aflatoxines, l'ochratoxine, les trichothécènes, la stérigmatocystine, la zéaralénone, la citrinine, la patuline, l'acide pénicillique, les fumonisines (D'Mello et McDonald, 1997 ; Scudamore et Livesey, 1998) (tableau 8). L'origine chimique des mycotoxines est très diverse puisque certaines dérivent des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, salframine, gliotoxine, roquefortine, sporidesmine), d'autres des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxine, patuline, citrinine, acide pénicillique, stérigmatocystine, zéaralénone) et d'autres sont des dérivés terpéniques (diacétoxyscirpénol, fusarénone, désoxynivalénol, roridines, toxine T-2, verrucarine).

Tableau 8 : Moisissures et mycotoxines retrouvées dans divers aliments.

Champignons		
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxines Stérigmatocystine Ochratoxine A	Maïs, cacahuètes, graines de coton, de potiron, riz, haricots, tissus d'animaux (jambon, lard, saucisses), lait et dérivés
<i>Fusarium</i>	Trichothécènes (DON, NIV, Toxine T-2, DAS) Zéaralénone, Fumonisines, Fusarine, Moniliformine	Blé, maïs, orge, riz, seigle, avoine, noix
<i>Penicillium</i>	Patuline, Citrinine, Pénitrem A, Acide cyclopiazonique, ochratoxine A	Fruits et jus de fruits, blé, riz, fromage, noix
<i>Alternaria</i>	Alternariol Acide Ténuaazonique	Fruits, légumes et produits dérivés de pomme et tomates
<i>Claviceps</i>	Alcaloïdes de l'Ergot	Blé et dérivés, seigle

Les substances contaminées sont très diverses. Toutes les denrées alimentaires peuvent être détériorées (tableau 9).

Tableau 9 : Exemples de produits contaminés par des moisissures toxigéniques (CAST, 1989).

Denrées	Espèces toxiques contaminantes	Mycotoxines probables
Blé, Farine, pain, maïs, chips	<i>Aspergillus flavus, ochraceus, versicolor</i> <i>Penicillium citrinum, citréoviride, cyclopium, P. martensii, patulum, pubertum</i> <i>Fusarium moniliforme</i>	Aflatoxines, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, acide pénicillique, désoxyynivalénol, zéaralénone, fumonisine
Arachide, noix	<i>Aspergillus flavus, ochraceus, versicolor ; Penicillium citrinum, cyclopium, expansum</i>	Aflatoxines, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, trichothécènes, cytochalasines
Tourte à la viande, viande cuite, fromage, cacao, houblon	<i>Aspergillus flavus, Penicillium viridicatum, roqueforti, patulum, commune</i>	Aflatoxines, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, acide pénicillique
Viandes, porc salé, fromage	<i>Aspergillus flavus, ochraceus, versicolor, Penicillium viridicatum, cyclopium</i>	Aflatoxines, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, acide pénicillique, pénitrem
Poivre noir et rouge, pâtes	<i>Aspergillus flavus, ochraceus</i>	Aflatoxines, Ochratoxine,
Fèves, orge, maïs, sorgho, soja	<i>Aspergillus flavus, ochraceus, versicolor</i> <i>Alternaria,</i> <i>Fusarium moniliforme,</i> <i>Penicillium cyclopium, viridicatum, citrinum, expansum, islandicum, urticae</i>	Aflatoxines, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, acide pénicillique, citrinine, griséofulvine, alternariol
Pâtisserie réfrigérée ou congelée	<i>Aspergillus flavus, versicolor, Penicillium cyclopium, viridicatum, citrinum, martensii, citreo-viride, palitans, puberulum, roquefort, urticae</i>	Aflatoxines, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, acide pénicillique, citrinine, penitrem
Denrée alimentaire (stockage domestique)	<i>Penicillium, Aspergillus, Fusarium oxysporum</i>	Aflatoxine, acide kojique, ochratoxine, pénitrem, patuline, acide pénicillique, trichothécènes
Pomme et produits dérivés de pomme	<i>Penicillium expansum</i>	Patuline

I-12.1 Dans les Céréales

Les céréales sont des vecteurs de mycotoxines très importants car elles sont universellement consommées par l'homme et par les animaux. Elles peuvent être contaminées à plusieurs moments (en plein champ ou lors du stockage). En général, ce sont les insectes qui en sont responsables. Environ 55 millions de tonnes de céréales sont perdus chaque année dans le monde. L'enquête réalisée par Pittet à l'échelle mondiale (1998) montre que 25 à 40% des

céréales sont contaminées par des mycotoxines. Ce sont surtout dans les pays aux conditions climatiques chaudes et humides (en particulier les pays africains, Asie du Sud et Amérique du Sud) que la croissance des champignons toxigènes est le plus favorisée. Ainsi, le riz, le maïs et le millet, aliments de base des populations de ces pays, sont souvent contaminés surtout par les aflatoxines. Toutefois, les pays de l'Europe du Nord sont également touchés surtout par l'OTA sécrétée par des espèces appartenant au genre *Penicillium* (*P.verrucosum*, *P.nordicum*) dont la croissance et la toxigénèse ne requièrent pas des températures élevées.

I-12.2 Dans les oléagineux

Dans les graines et les tourteaux, couramment utilisés en alimentation animale, on trouve des *Aspergillii*, des *Fusaria* et des *Penicillia*. Les noix au sens large et les oléagineux sous les climats chauds et humides sont des supports privilégiés pour la croissance d'*Aspergillus flavus*. Les graines d'arachides, de coton et les produits dérivés, farines et huiles, contiennent très souvent de l'aflatoxine B1 (Groopman et Donahue, 1988).

I-12.3 Dans les fruits et légumes

Les fruits et les légumes sont recouverts d'une multitude de champignons à l'état de spores qui peuvent proliférer aisément si les conditions de stockage leur sont favorables. Les fruits sont souvent altérés par des *Penicillia*, comme *P. digitatum* et *italicum* se développant sur les agrumes. Toutefois, la plupart ne sont pas toxigènes, bien qu'on puisse retrouver de la zéaralénone et des trichothécènes sur des bananes. Il faut aussi porter une attention particulière à certains produits tels que les jus de pommes, les compotes ou les petits pots pour bébés où des pommes pourries risquent d'être mélangées à des pommes saines et peuvent de ce fait augmenter le risque d'une contamination par la patuline provenant de *P. expansum* (Bissessur *et al.*, 2001). Les jus de fruit insuffisamment stérilisés peuvent être envahis par des *Byssochlamys* dont les spores résistent à très haute température (Percebois *et al.*, 1975) .

I-12.4 Dans les viandes et les produits de charcuterie

Les produits de charcuterie sont quelques fois recouverts de moisissures mais le substrat n'est pas forcément favorable à la production de mycotoxines. Néanmoins, des moisissures toxiques peuvent se développer comme *Wallemia sebi* responsable de la production de la walleminol A (wood *et al.*, 1990). La contamination des viandes est plutôt le résultat d'une transmission par le biais de la chaîne alimentaire. L'accumulation d'aflatoxines dans les viandes est peu probable. En revanche il n'est pas impossible que les mycotoxines s'accumulent pour partie dans le foie et le rein. Par contre, l'ochratoxine A est fréquemment retrouvée dans le muscle de porc et de volaille ainsi que dans les abats et constitue de ce fait une source non négligeable en cette mycotoxine (Malagutti *et al.*, 2005).

I-12.5 Dans le lait et les produits laitiers

Une très grande variété de moisissures est utilisée dans la filière lait et produits dérivés. Certaines sont utilisées dans les fromages fermentés (il s'agit de ce qu'on appelle les « moisissures nobles » comme *P. roqueforti* et *P. camemberti*). De plus, on trouve aussi des moisissures qui n'ont pas été désirées et qui se révèlent néfastes. Ainsi, *Mucor* est responsable de l'accident dit « poil de chat » principalement en fromage à pâte moelle, se caractérisant par un défaut d'aspect des fromages, et par l'apparition de mauvais goûts. De même, *Geotrichum candidum* peut devenir un agent d'altération (défaut de texture et de goût) (Beuvier et Feutry, 2005).

La contamination exogène peut concerner de nombreuses souches de moisissures (les plus fréquentes appartenant au genre *Penicillium* du fait de sa capacité à se développer à basses températures).

Les espèces contaminant le lait en poudre et les yaourts appartiennent aux genres *Mucor*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporius*, *Aspergillus* et *Rhizopus* (le bars-Bailly *et al.*, 1999).

L'AFB₁ produite par *A. flavus* est excrétée dans le lait sous forme d'AFM1 (Spahr *et al.*, 2000).

I-12.6 Dans les autres produits

Le cacao, les épices, les amandes, les raisins secs, les pistaches, les cacahuètes, les produits emballés (pains de mie, biscuits, biscottes) sont aussi concernés par la présence de mycotoxines (Miraglia et Brera, 2002).

I-13. Ochratoxine A et filière raisin

Jusqu'à présent, les céréales sont considérées comme étant la principale source de contamination en Ochratoxine A. Des travaux récents (Zimmerli et Dick, 1996 ; Visconti *et al.*, 1999 ; Castellari *et al.*, 2000 ; Markaki *et al.*, 2001 ; Otteneder et Majerus, 2000), ont permis de mettre en évidence la présence de taux non négligeables de cette toxine dans le vin et le jus de raisin ($7\mu\text{g.L}^{-1}$).

De plus, le vin a récemment été considéré comme étant la seconde source de contamination en OTA (10 à 15% de la prise totale en OTA) (Cabanès *et al.*, 2002 ; Stefanaki *et al.*, 2003 ; Shephard *et al.*, 2003 ; Otteneder et Majerus, 2000).

La figure 18 montre la contribution de certaines denrées alimentaires à la prise diététique moyenne d'OTA dans certains pays de la communauté Européenne où le vin présente 13 % du taux d'OTA consommé (Miraglia et Brera, 2002).

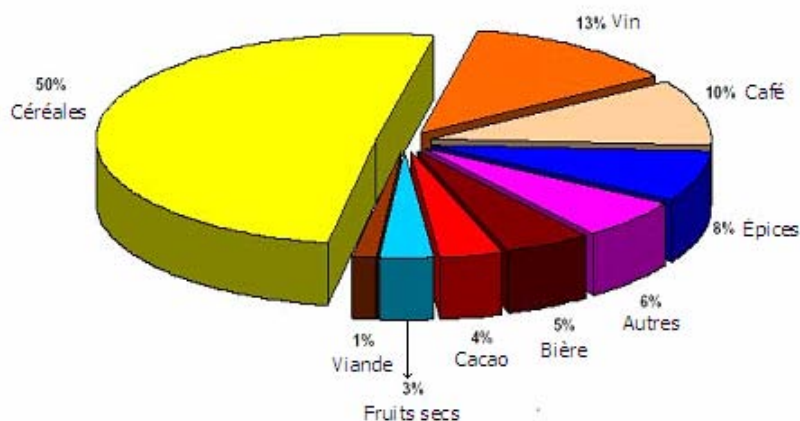


Figure 18 : Contribution de certaines denrées alimentaires à la prise diététique moyenne d'OTA dans certains pays de la Communauté Européenne (Miraglia et Brera, 2002).

Cette présence d'OTA dans le vin a été expliquée par le fait que les raisins ont été contaminés au vignoble par différentes espèces de champignons ochratoxinogènes dont la production d'OTA augmente de plus en plus avec les étapes de maturation (Bejaoui *et al.*, 2006 ; Cabanes *et al.*, 2002 ; Da Rocha Rosa *et al.*, 2002 ; Markaki *et al.*, 2001). La date des vendanges aurait donc une incidence importante sur la teneur en OTA des baies et donc du moût.

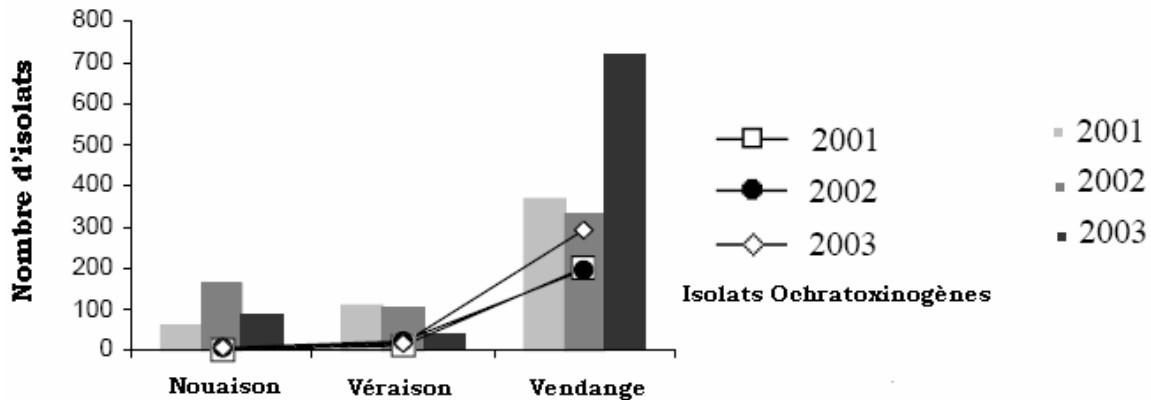


Figure 19 : Évolution de la flore mycélienne totale et des isolats ochratoxinogènes en fonction des stades de maturation de la grappe (la nouaison, la véraison et la vendange) (Bejaoui *et al.*, 2006).

D'ailleurs, pour pallier les risques de contamination liés à une maturation trop avancée, les producteurs de jus de raisin préfèrent, quand c'est possible récolter des raisins en début de campagne. Les viticulteurs, en recherchant des taux de sucre élevés, ne peuvent pas adopter la même stratégie.

De plus, il a été rapporté que la concentration en OTA est plus faible dans les vins blancs, alors qu'elle plus importante au niveau des vins rouges (Otteneder et Majerus, 2000 ; Zimmerli et Dick, 1996 ; Burdaspal et Legarada, 1999 ; Ospital *et al.*, 1998 ; Blesa *et al.*, 2004) (tableau 10).

Tableau 10 : Contamination des vins en fonction de leurs natures, pour différents pays européens

Nombre d'échantillons	Type de vin	Pourcentage des échantillons contaminés	Moyenne ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Intervale	Référence
60	Blanc	25%	0.108	0,01-1,36	<i>Majerus et Otteneder, 2000</i>
55	Rosé	40%	0.119	0,01-2,38	
305	Rouge	54%	0.201	0,01-3,31	
4	Blanc	25%	0.01	0,01-0,02	<i>Ospital et al., 1998</i>
2	Rosé	50%	0.035	0,01-0,11	
21	Rouge	57%	0.08	0,01-0,27	
69	Blanc	65%	0.020	0,003-0,267	<i>Burdaspal et Legarda, 1999</i>
32	Rosé	91%	0.031	0,003-0,161	
91	Rouge	93%	0.054	0,003-0,603	

La figure 20 montre le taux de contamination d'échantillons de vins rouges en OTA dans différents pays de la Communauté Européenne, alors que la figure 21 donne les mêmes indications pour les vins blancs.

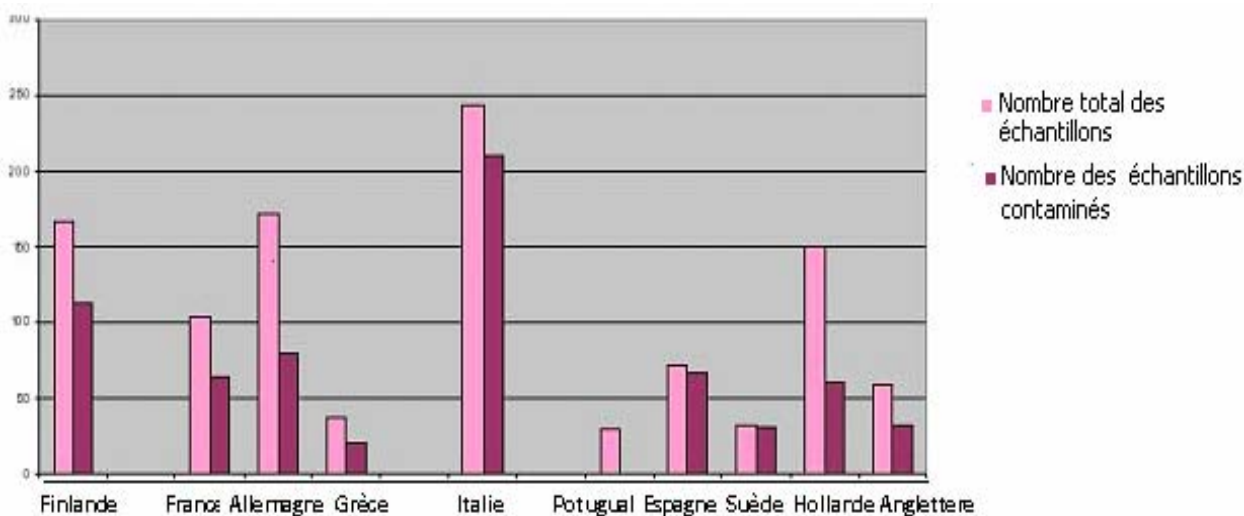


Figure 20: Nombre des échantillons totaux de vins rouges et ceux contaminés en OTA dans différents pays Européens (Miraglia et Brera, 2002).

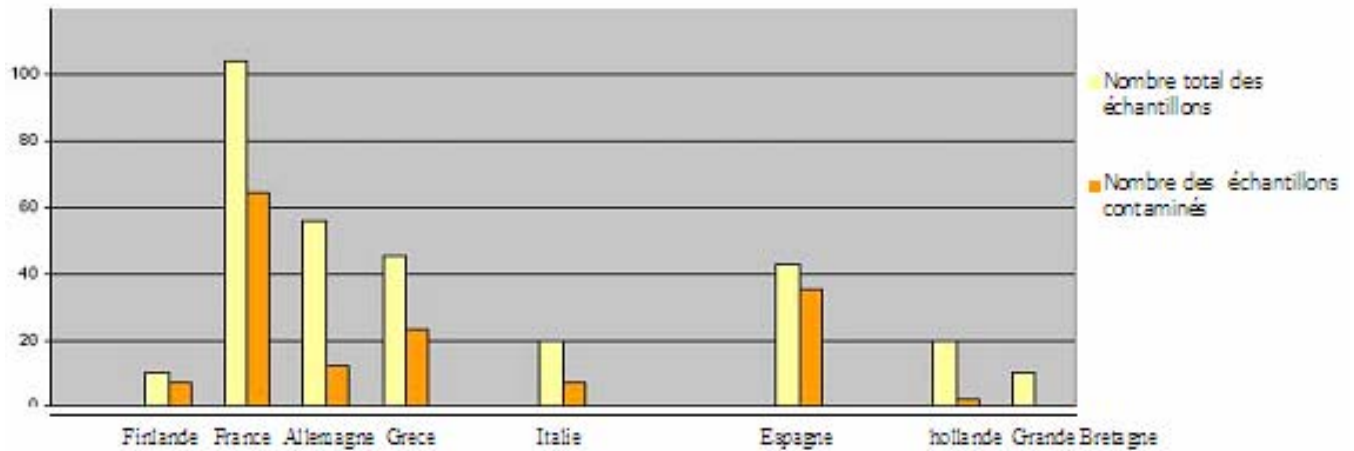


Figure 21: Nombre des échantillons totaux de vins blancs et ceux contaminés en OTA dans différents pays Européens (Miraglia et Brera, 2002).

Les différences observées peuvent être expliquées par la différence des opérations technologiques correspondant aux différents types de vins (Zimmerli et Dick, 1996 ; Wallrauch, 1998 ; Anonymous, 1999 ; Serra *et al.*, 2003). Or, alors que les raisins blancs sont directement pressés après la vendange, les raisins rouges sont macérés plusieurs jours ce qui facilite donc le passage de l'Ochratoxine A dans les moûts (Zimmerli et Dick, 1996).

Cependant, une autre hypothèse s'inscrit en faveur de la production d'OTA au niveau de la macération. A ce stade, les conditions de développement des champignons deviennent favorables, accentuées par des conditions aérobies et l'absence de fermentation. Cette hypothèse s'appuie sur les observations des jus de raisins rouges qui contiennent également des taux élevés d'OTA. Ceci pourrait être lié à l'activité de certaines enzymes péctolytiques impliquées dans la dissolution de certains pigments naturels se trouvant au niveau de la peau (Otteneder et Majerus, 2000 ; Shephard *et al.*, 2003). Or, durant ce processus le contact étroit entre la peau externe et le jus, ainsi qu'une température relativement élevée et des conditions aérobies liées à l'absence de fermentation alcoolique, se combinent et facilitent le développement des moisissures et par suite la production d'OTA. Toutefois, cette hypothèse reste à démontrer.

Vu l'impossibilité pour le moment d'empêcher totalement la contamination des raisins par l'OTA, il est par conséquent impératif de continuer à étudier comment améliorer les pratiques visant à réduire cette contamination. Une piste importante repose sur le contrôle de la

balance des acides organiques des vins et des jus de raisins (Coloretti *et al.*, 2002). Atoui *et al.* (2003) ont testé l'effet des acides organiques (malique et tartrique) sur la cinétique d'excrétion d'OTA durant la germination des spores d'*A. carbonarius* sur milieu modèle CYA. Ils ont trouvé que l'ajout de ces deux acides provoque une inhibition du relarguage de l'OTA à partir des spores de cette espèce. Ce résultat s'avère important vu que ces deux acides sont utilisés dans les moûts pour l'ajustement du pH.

I-14. Aflatoxine B1 et filière raisin

Jusqu'à présent la contamination du raisin et ses dérivés par l'AFB1 n'a pas été constatée. Les champignons producteurs appartenant à la section *flavi* sont considérés comme contaminants non habituels des raisins. Les études réalisées sur des vignobles méditerranéens ont conclu à l'absence de ces champignons producteurs. D'autres études (Martinez-Culebras *et al.*, 2006 ; Melki Ben Fredj *et al.*, 2006 ; Medina *et al.*, 2005) ont montré que les pourcentages d'*A. flavus* isolés furent très faibles, cependant l'estimation du taux d'AFB1 dans le moût n'a pas été faite. Il semble que les conditions climatiques nécessaires ne favorisent pas la croissance des champignons de la section *flavi* et donc l'aflatoxigénèse dans ces pays.

Réglementation et Législation

I-15. Ochratoxine A

En 1990, le JECFA a décidé d'établir une dose journalière tolérable hebdomadaire de 112ng d'OTA par kilo de poids corporel, cette valeur ayant été déterminée sur la base des données de néphropathies porcines.

Le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, sur la base des études de carcinogénicité, a proposé une exposition journalière tolérable de 5ng/kg pc/jour, ce qui implique une contamination maximale dans les céréales de 5µg/kg.

Le comité Scientifique de l'alimentation Humaine a estimé dans son avis sur l'OTA du 17 septembre 1998, qu'il serait prudent de réduire autant que possible l'exposition à l'OTA, en veillant à ce que les expositions se situent près de la fourchette inférieure des expositions tolérables (comprises entre 1,2 et 14 ng/kg de poids corporel et par jour), soit par exemple en dessous de 5ng/kg de poids corporel et par jour. Le règlement CE N° 472/2002 de la Commission du 12 mars 2002 modifie le règlement CE N°466/2001 fixant des teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. Ce règlement limite la contamination en OTA dans les céréales brutes, y compris sur le riz et le sarrasin, à 5µg/kg.

En ce qui concerne les produits dérivés de céréales, la contamination est limitée à 3µg/kg. Ce règlement fait également état d'une limitation à 10µg d'OTA/kg de raisins secs. Par la suite, le règlement CE N° 683/2004 du 13 avril 2004 modifiant le règlement N°466/2001 a inclus une directive limitant la contamination en OTA à 0,5µg/kg d'aliment dans les préparations à base de céréales et aliments pour bébés, destinés aux nourrissons et enfants en bas age, ainsi que dans les aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales pour les nourrissons. La dernière évaluation de l'OTA a donné lieu au règlement N° 123/2005 modifiant le règlement N°466/2001 qui prend en compte la contribution d'aliments tels que le vin, les jus de raisin ou le café dans l'exposition de l'homme à l'OTA. Ce règlement ne modifie pas les teneurs maximales établies précédemment sur les céréales ou les raisins. Il inclut une nouvelle directive limitant la contamination en OTA dans les jus de raisin, les vins rouges, blancs, et rosés, ainsi que dans les autres boissons à base de vin ou de moût, à 2µg/kg. Une directive vise également à limiter la contamination en OTA dans le

café ; celle-ci fixe le taux maximal en OTA à 5µg/kg dans les grains de café torréfiés et à 10µg/kg dans le café soluble.

Le règlement CE N° 466/2001 rappelle qu'il est interdit de mélanger des produits conformes aux limitations avec des produits non-conformes, afin d'en abaisser le taux de contamination, et que l'utilisation de produits non conformes aux teneurs établies pour la préparation d'autres aliments est interdite. Il est également interdit d'utiliser des traitements chimiques pour la décontamination en OTA des produits destinés à l'alimentation humaine. Le mode d'échantillonnage, ainsi que les méthodes d'analyses, pour la détermination de la teneur en OTA dans les denrées alimentaires, sont décrits dans la directive 2002/26/CE, publiée au Journal Officiel n°L 075. Ces directives visant à estimer et à limiter la présence d'OTA dans divers aliments, impliquent la mise en place de plans ayant pour objectif de réduire la contamination des denrées par cette mycotoxine. Diverses stratégies peuvent être adoptées afin d'obtenir des produits en accord avec la réglementation Européenne. Il s'agira d'observer des bonnes pratiques agricoles, ou de décontaminer le produit fini.

I-16. Aflatoxine B1

À la suite des travaux du groupe d'experts "contaminants agricoles", la Commission a été en mesure de présenter des propositions de valeurs limites pour les aflatoxines B et G, ainsi que pour l'aflatoxine M₁, dans diverses denrées alimentaires. Ces propositions ont reçu l'accord du Comité Permanent des Denrées Alimentaires (CPDA), et ont finalement donné naissance au règlement (CE) de la Commission N°1525/98 (publié au JOCE L 201 du 17/7/98).

Ce texte, qui complète le règlement N°194/97 du 31 janvier 1997 (teneurs maximales en nitrates des laitues et épinards), est applicable à partir du 1^{er} janvier 1999 dans tous les États-membres de l'Union Européenne.

Ce règlement N°1525/98 se réfère à l'avis du CSAH du 24 septembre 1994, en rappelant que les aflatoxines, en particulier l'AFB₁, sont des substances cancérigènes génotoxiques ; pour ce type de substances, il n'existe aucun seuil en dessous duquel aucun effet néfaste n'est observé, et il n'est donc pas possible de fixer une dose journalière admissible.

Cependant, ce principe doit être nuancé car, en l'état actuel des connaissances scientifiques et techniques, il n'est pas possible d'éviter totalement le développement des moisissures, et donc la présence d'aflatoxines dans les denrées alimentaires ; par conséquent, il convient de fixer les limites dans les denrées alimentaires au niveau le plus faible techniquement possible.

Bien que l'AFB1 soit de loin le composé le plus toxique, la présence des autres aflatoxines dans les denrées alimentaires ne peut pas être négligée, et leurs teneurs respectives varient d'une denrée à l'autre ; c'est pourquoi le règlement N°1525/98 prévoit, pour des raisons de sécurité, de limiter à la fois la teneur en AFB1 et la teneur en aflatoxines totales (B1+B2+G1+G2) dans les denrées alimentaires.

De même, bien que l'aflatoxine M1 soit un produit de métabolisation de l'AFB1, présent dans le lait des animaux ayant consommé des aliments contaminés par l'AFB1, et bien que cette aflatoxine M1 soit une substance cancérogène génotoxique moins dangereuse que l'AFB1, il est impératif de limiter sa présence dans le lait et les produits laitiers qui sont consommés par les êtres humains, et notamment par les enfants en bas âge.

Certaines denrées alimentaires vont subir, avant consommation humaine, des traitements qui réduisent leur niveau de contamination en aflatoxines. Le règlement N°1525/98 a donc prévu ces cas spécifiques, dans le but de minimiser les effets sur le commerce :

Sachant que des méthodes de triage ou d'autres traitements physiques permettent de réduire la teneur en aflatoxines des arachides, des fruits à coque et des fruits séchés, des teneurs en aflatoxines plus élevées sont acceptables pour les produits en cause lorsque ceux-ci ne sont pas destinés à la consommation humaine directe ou utilisés comme ingrédients de denrées alimentaires.

Dans ce cas, les niveaux en aflatoxines ont été fixés en prenant à la fois en considération les possibilités actuelles de traitements précédemment citées, et la nécessité de respecter après traitement les teneurs maximales fixées pour ces produits destinés à la consommation humaine directe.

En ce qui concerne plus spécifiquement les arachides destinées à subir un traitement ultérieur, les limites maximales fixées diffèrent de celles retenues pour les autres fruits à

coque et les fruits séchés, pour tenir compte des travaux en cours au sein du *Codex Alimentarius*.

Dans le cas des céréales également, des méthodes de triage ou d'autres traitements physiques pourraient réduire le niveau de contamination en aflatoxines.

Le règlement N°1525/98 a fixé les limites maximales présentées dans le Tableau 1 pour les aflatoxines potentiellement présentes dans les denrées alimentaires.

Ce règlement précise aussi que les limites maximales fixées, qui sont prévues pour les produits destinés à la consommation humaine directe ou utilisés comme ingrédients de produits alimentaires, s'appliquent également aux produits dérivés de leur transformation, sauf si des limites maximales spécifiques à ces produits dérivés existent déjà.

Dans le cas d'une contamination aussi hétérogène que celle des mycotoxines présentes dans des produits en grains, le niveau de limites maximales retenu est fortement tributaire du mode d'échantillonnage pratiqué, ainsi que de la méthode d'analyse utilisée. C'est pourquoi la Commission européenne a souhaité compléter le règlement en question par une directive européenne spécifiant le mode d'échantillonnage et la méthode d'analyse à appliquer. C'est à ce texte que renvoie chaque limite maximale mentionnée dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Teneurs maximales en aflatoxines B et G et en aflatoxine M₁ admissibles dans diverses denrées alimentaires selon le règlement (CE) N°1525/98 de la Commission

Produit	Aflatoxines : teneurs maximales admises en µg/Kg			Mode de prélèvement	Méthode d'analyse de référence
	B ₁	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M ₁		
2.1.1.1. Arachides, fruits à coque et fruits séchés et les produits dérivés de leur transformation, destinés à la consommation humaine directe ou comme ingrédient de denrées alimentaires	2	4	---	Directive 98/53/CE	Directive 98/53/CE
2.1.1.2. Arachides destinées à être soumises à un traitement de triage ou à d'autres méthodes physiques avant leur consommation humaine ou leur utilisation comme ingrédient de denrées alimentaires	8	15	---	Directive 98/53/CE	Directive 98/53/CE
2.1.1.3. Fruits à coque et fruits séchés destinés à être soumis à un traitement de triage ou à d'autres méthodes physiques avant leur consommation humaine ou leur utilisation comme ingrédient de denrées alimentaires	5	10	---	Directive 98/53/CE	Directive 98/53/CE
2.1.2.1. Céréales (y compris le sarrasin) et les produits dérivés de leur transformation, destinés à la consommation humaine directe ou comme ingrédient de denrées alimentaires	2	4	---	Directive 98/53/CE	Directive 98/53/CE
2.1.2.2. Céréales (y compris le sarrasin) destinées à être soumises à un traitement de triage ou à d'autres méthodes physiques avant leur consommation humaine ou leur utilisation comme ingrédient de denrées alimentaires	2	4	---	Directive 98/53/CE	Directive 98/53/CE
2.1.3. Lait [lait cru, lait destiné à la fabrication de produits à base de lait, lait de consommation traité thermiquement tel que défini par la directive 92/46/CEE du Conseil du 16 juin 1992 (JO L 268 du 14/9/92)]	---	---	0,05	Directive 98/53/CE	Directive 98/53/CE

II- Matériels et Méthodes

II-1. Produits et Appareillage

Une liste des produits et des appareils utilisés durant le travail figure en Annexe (Anx I).

II-2. Milieux de cultures

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés pour l'isolement et l'identification des champignons.

Dichloran Rose Bengale Chloramphénicol Agar (DRBC)

Ce milieu ralentit le développement des moisissures envahissantes tels que les *Mucor* et les *Rhizopus*, et a permis d'isoler celles appartenant à d'autres genres *Penicillium* et *Aspergillus*. La présence de chloramphénicol antibiotique bactérien permet d'éviter une contamination bactérienne.

La composition pour 1 litre est la suivante :

Glucose	10 g
Peptone de viande	5 g
DihydrogK _H PO ₄	1 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 g
Rose Bengale	25 mg (soit 0.5 ml d'une solution à 5% poids/volume dans l'eau)
Dichloran	2 mg (soit 1ml d'une solution à 0.2% poids/volume dans l'éthanol)
Chloramphénicol	100 mg
Agar	15 g
Eau distillée	qsp 1 L

Le milieu est autoclavé pendant 15 minutes à 121°C. Le pH final est ajusté entre 5.5 et 5.8 avec une solution de HCl 2N.

Czapek Dox Agar (CZ)

Le milieu CZ a été utilisé comme milieu de croissance des moisissures isolées à partir des grappes de raisins et, permet de re-isoler les champignons en question dans le cas de contamination. Sa composition nécessite la préparation préalable de 3 solutions : solution A, solution C et la solution métallique (Cu + Zn).

La composition pour 1 litre de CZ est la suivante:

Saccharose	30 g
Solution A	50 ml
Solution C	50 ml
Solution métallique (Cu +Zn)	1 ml
Agar	15 g
Eau distillée	qsp 1 L

Le milieu est autoclavé pour 15 minutes à 121°C. Le pH final est ajusté entre 5.5 et 5.8 avec une solution de HCl 2N.

La composition des trois solutions intermédiaires est donnée ci-dessous : Solution A :

NaNO ₃	20 g
KCl	5 g
MgSO ₄	5 g
FeSO ₄	0.1 g
Eau distillée	qsp 500 ml

Solution C :

K ₂ HPO ₄	10 g
Eau distillée	500 ml

Solution métallique (Cu +Zn):

ZnSO ₄ , 7H ₂ O	1 g
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.5 g
Eau distillée	100 ml

Czapek Yeast Agar (CYA) :

Le milieu CYA a été utilisé pour la croissance et l'identification des champignons appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*. De plus, ce milieu a aussi été utilisé dans le test de production d'OTA et d'AFB1 (milieu optimal pour la production des mycotoxines) ainsi que pour la conservation des moisissures (+ 4°C) en attente du stockage dans le glycérol.

La composition d'1 litre de CYA est la suivante :

Saccharose	30 g
Extrait de levures	5 g
Solution A	50 ml
Solution C	50 ml
Solution Cu +Zn	1 ml
Agar-Agar	15 g
Eau distillée	qsp 1 L

Le pH final est de 6.7 ajusté avec une solution HCl 2N.

En fin de préparation le milieu est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes.

A noter que les solutions A, C et la solution métallique sont les mêmes que pour le milieu CZ.

Synthetic Grape Medium (SGM):

C'est un milieu synthétique qui possède presque les mêmes constituants des grappes à maturité et qui a été utilisé dans les études de croissance et de la toxigénèse des champignons aflatoxinogènes.

La composition pour 1 litre de ce milieu est la suivante :

Glucose	70 g
Fructose	30 g
Acide tartrique	7 g
Acide malique	10 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.67 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.67 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.75 g
NaCl	0.15 g
CaCl ₂	0.15 g
CuCl ₂	0.0015 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.021 g
ZnSO ₄	0.0075 g
Catéchine	0.05 g
Agar	20 g
Eau distillée	qsp 1 L

Le pH est ajusté à 4.2 avec une solution de KOH 2N.

Le milieu est autoclavé pendant 15 minutes à 121°C.

II-3 Méthodes

II-3-1. Etude et analyse des vins fins libanais:

Ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec le secteur professionnel.

II-3-1.1 Collecte des échantillons :

64 échantillons de vins (tableau 12) appartenant à différents terroirs, différents cépages ainsi que différents millésimes (1996 à 2003) ont été fournis par le producteur pour analyse au laboratoire. Les échantillons ont été alors stockés au réfrigérateur à 4°C avant d'être analysés.

La carte géographique des vignobles (figure 22) permet de situer les terroirs dont sont issus les vins à analyser.

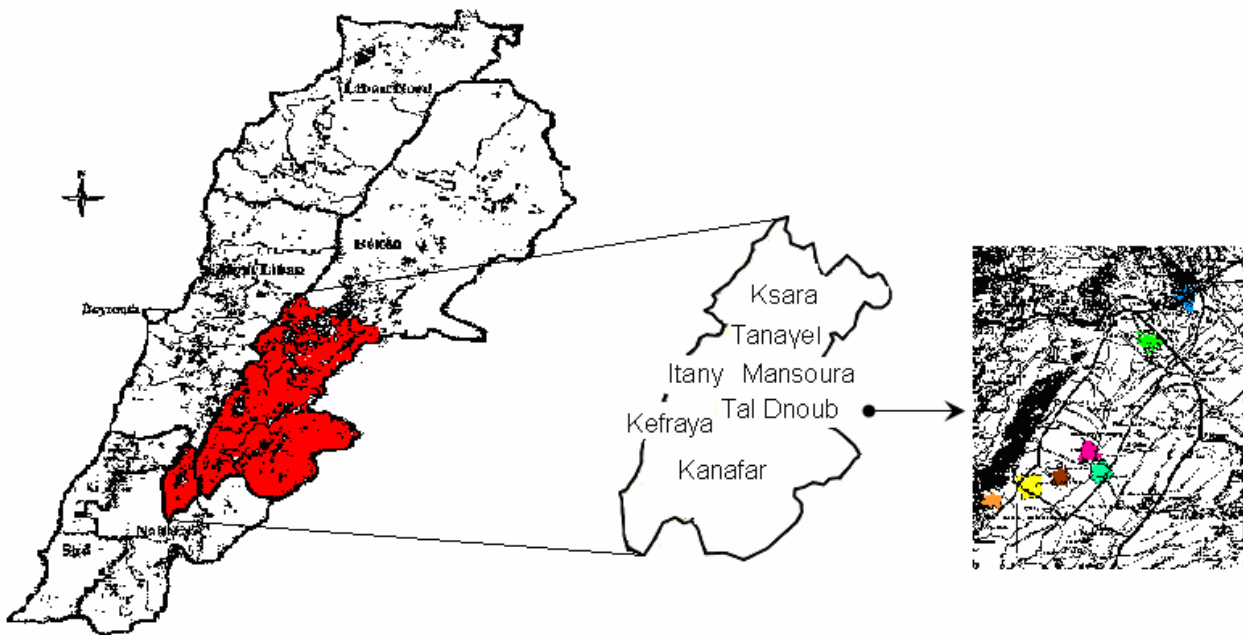


Figure 22: localisation géographique du vignoble libanais, carte des terroirs concernés

Tableau 12: Composition en termes de cépage des vins analysés et origine des échantillons.

Cépages (échantillons en fonction des cépages)	Cuves (Nom)	Origine
Cabernet Sauvignon : 28,93%	Duplay 2	Itany :65% ; Mansoura :25% ; Tanayel:10 %
	Bouat 8	Mansoura :81% ; Ksara :19%
	Barrandon 16	Mansoura
	Duplay 25	Mansoura
	Duplay 27	Itany
	Duplay 28	Tanayel
Syrah :19,34%	Bouat 10	Kanafar
	Bergeret 2	Kefraya :45%, Mansoura :55%
	Bouat 1	Tal Dnoub
Merlot :14,78%	Duplay 15	Itany :68%, Kanafar :32%
	Duplay 18	Kanafar
	Duplay 26	Tal Dnoub
	Cremona	Itany :49% ; Tal Dnoub :38% ; Mansoura :13%
Cabernet Franc :14,35%	Duplay 12	Itany
	Duplay 24	Tal Dnoub
	Bergeret 3	Mansoura
	Bergeret 4	Tal Dnoub :51% ; Itany 49%
Petit Verdot :4,12%	Bergeret 11	Tal Dnoub
	Duplay 11	Tal Dnoub :54% ; Itany :46%
Carignan :4,25%	Duplay 1	Tanayel
Caladoc :2,58%	Duplay 4	Mansoura :33,5% ; Kanafar :36% ; Tal Dnoub :30,5%
Arinarnoa :1,11%	Barrandon 26	Itany
Marselan :1,06%	Barrandon 4	Itany
Mourvèdre :1,06%	Barrandon 2	Kanafar
Cinsault :8,42%	Bouat 7	Kefraya :81% ; Mansoura :19%
Presses Cabernet Sauvignon	---	Divers
Presses Cabernet Franc	---	Divers
Presses Merlot, Petit Verdot	---	Divers

II-4. Dosage d'OTA:

II-4.1 Test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Le dosage consiste à effectuer un test ELISA compétitif (CD-ELISA) permettant de déterminer la concentration approximative d'Ochratoxine A contenue dans l'échantillon.

Le test utilisé est le « *Ochratoxin quantitative test kit ; Veratox ; Product # 8610* ». La limite de détection est de 1 ppb (qualitatif) et la limite de quantification est de 2 ppb. La gamme de quantification s'étend de 2 à 25 ppb.

a- Principe :

L'Ochratoxine A libre de l'échantillon entre en compétition avec de l'Ochratoxine A couplée à une peroxydase (Horseradish Peroxydase) pour les sites de fixation de l'anticorps anti-ochratoxine A utilisé. Après lavage, le substrat de la peroxydase est ajouté, une couleur bleue est alors obtenue suite au clivage du substrat. L'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la quantité d'ochratoxine A. Le test est lu dans un lecteur multipuits et les densités optiques (DO) des différents échantillons analysés sont déterminées. Les DO des puits contrôles sont utilisées pour tracer une gamme étalon à partir de laquelle les concentrations exactes d'Ochratoxine A sont calculées.

Cependant ce test n'est considéré que comme un test de criblage préliminaire vu les risques d'erreurs que peut induire la matrice biologique complexe de l'échantillon.

b-Mode opératoire :

- Préparation d'une solution de méthanol 50 % (vol/vol).
- Ajout de 4 ml de la solution de méthanol 50 % à 1 ml de vin, puis agitation pendant 5 min.
- Filtration de la solution sur du papier Whatman # 1, ou à l'aide d'un filtre sur une seringue (Neogen filter syringe 0.45µm).
- Préparation des kits d'analyse. Pour chaque échantillon à tester, préparation selon le protocole du Kit d'un puit rouge plus 5 autres puits rouges pour les contrôles.
- Préparation de 6 puits blancs contenant l'anticorps anti-ochratoxine A.
- Ajout de 100µl de l'Ochratoxine-HRP conjuguée dans les puits rouges.

- Ajout de 100µl de chacun des contrôles (gamme étalon) dans les 5 puits rouges correspondants et de 100µl de l'échantillon à doser dans le puit rouge correspondant.
- Homogénéisation du liquide contenu dans chaque puit à l'aide d'une pipette de 200µl en faisant des aller et retour (3 fois).
- Transfert de 100µl de chaque puit rouge au puit anticorps anti-Ochratoxine A correspondant.
- Agitation modérée du portoir des puits pendant 20 secondes (attention à ne pas avoir de projection du liquide).
- Incubation de 10 minutes à température ambiante.
- Vidange du contenu des puits et lavage avec de l'eau distillée (5 fois).
- Ajout de 100µl du substrat <K-Blue substrate solution> dans chaque puit.
- Agitation pendant 20 secondes.
- Incubation de 10 minutes à température ambiante.
- Ajout de 100µl de la solution <red stop> à chaque puit.
- Agitation pendant 20 secondes.
- Lecture des micropuits dans un lecteur de microplaques à 650 nm. La lecture doit être faite dans les 20 minutes suivant l'addition de la solution <red stop>.
- Tracé de la courbe d'étalonnage à partir des résultats des puits contrôles et déduction de la quantité d'Ochratoxine A de l'échantillon à tester.

II-4.2 Dosage par HPLC

II-4.2.1 Extraction de l'OTA du moût et du vin après purification sur colonne d'immunoaffinité :

La Norme européenne (*NF EN 14133 ; Janvier 2004*), spécifie une méthode de détermination de la teneur en ochratoxine A dans le vin par Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée par un détection fluorimétrique (HPLC-FLD) après purification sur colonne d'immunoaffinité. L'analyse par HPLC présente un avantage principal, il s'agit d'un gain appréciable en détectabilité, sensibilité, spécificité et automaticité.

a-Principe :

Les échantillons de vin sont dilués à l'aide d'une solution contenant du polyéthylène glycol (PEG 8000) et de l'hydrogénocarbonate de sodium, puis ils sont filtrés et purifiés sur colonne d'immunoaffinité. L'Ochratoxine A est éluée à l'aide de méthanol et d'acide acétique puis quantifiée par HPLC en phase inverse couplée à une détection fluorimétrique.

b-Purification sur colonne d'immuno-affinité :

L'extraction et la purification de l'OTA se fait grâce à des colonnes d'immuno-affinité OCHRAPREP. Le protocole est le suivant :

- Après la dilution de l'échantillon (volume/volume) dans une solution aqueuse contenant par litre 10g PEG 8000 et 50 g NaHCO_3 , 10 ml sont déposés en haut de la colonne d'immuno-affinité et à un débit d'environ 1 goutte par seconde.
- La colonne est ensuite lavée par 5 ml d'une solution de rinçage (25 g NaCl et 5 g NaHCO_3 dans 1 litre d'eau) puis par 5 ml d'eau qualité HPLC à un débit de 2 gouttes par seconde.
- La colonne retient alors les molécules d'OTA grâce à un gel d'anticorps monoclonaux anti-OTA. L'éluat se fait, après lavage de la colonne, par 2 ml d'une solution de méthanol-acide acétique (98 : 2 vol/vol) à un débit d'une goutte par seconde.
- Évaporation de l'éluat jusqu'à siccité sous un flux d'azote à une température d'environ 50°C.
- Dissolution de l'éluat à nouveau dans 250µl de la phase mobile d'HPLC.

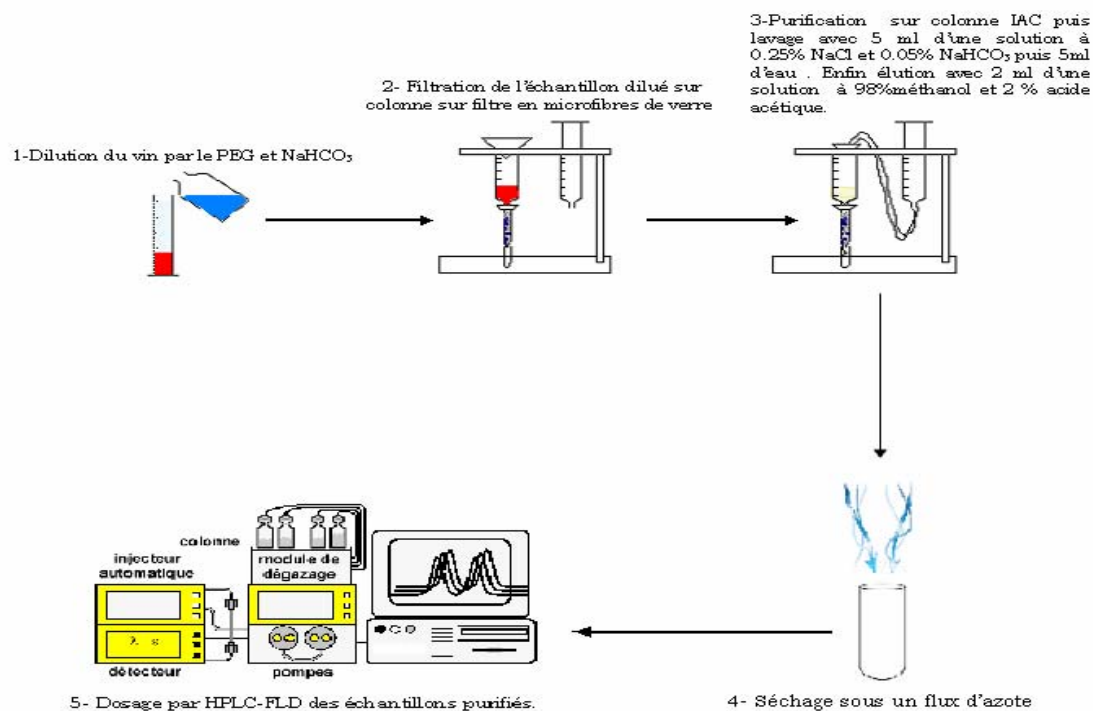


Figure 23: Schéma descriptif des différentes étapes d'analyse des échantillons du vin

II-4.2.2 Analyse de l'OTA par HPLC-FLD

L'appareil HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (BIO-TEK, Milan, Italie) permet une détection par fluorescence ($\lambda_{ex} = 332 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 466 \text{ nm}$) et par UV (détecteur à barrette de diode). Le système est équipé également d'une pompe permettant d'obtenir des gradients des solvants. Un logiciel (Kroma 3000) permet de piloter l'ensemble du système et d'assurer l'acquisition des données. La colonne analytique utilisée est de type Uptisphère 5 μm C18 ODB (150 x 4,6 mm) avec une pré-colonne de garde de 10 x 4 mm. La phase mobile est un mélange acétonitrile (B) / 0,2 % acide acétique (A) à un débit de 1 mL min⁻¹ et la température de la colonne est de 30 °C. Les injections sont effectuées avec un injecteur auto-sampler (BIO-TEK, Milan, Italie) et le volume d'injection est de 80 μl . Pour l'analyse ou la séparation des métabolites, deux programmes ont été utilisés.

Programme long sur 45 min

Solvant Temps (min)	A	B
0	90	10
30	50	50
35	10	90
43	10	90
45	90	10

Programme court sur 20 min

Solvant Temps (min)	A	B
0	49	51
20	49	51

Pour la quantification des métabolites, des courbes d'étalonnage ont été réalisées à partir de standards des différents métabolites.

II-4.3 Dosage de l'AFB1

II-4.3.1 Extraction de l'AFB1 à partir du moût après purification par extraction liquide-liquide :

L'extraction de l'AFB1 à partir des échantillons de moût a été adoptée de Mollinié *et al.*, (2005) et El Adlouni *et al.*, (2006), technique à partir de laquelle l'AFB1 a été dosée dans le moût.

a- Extraction à partir du moût :

- Prendre 10 ml de moût et mettre le volume prélevé dans une ampoule à décantation.
- Addition de 40 ml de n-hexane sur le volume prélevé, agitation 1 minute puis décantation 1 minute. La phase inférieure sera récupérée.
- Refaire la dernière étape sur la phase extraite.

b- Extracien chloroformique :

- Addition de 20 ml d'eau milliQ et de 40 ml de CHCl_3 à l'extrait.
- Agitation pendant 10 minutes puis décantation 10 minutes.
- Récupération de la phase inférieure dans un erlenmeyer propre « Phase Chloroformique » conservation de la phase supérieure dans l'erlenmeyer « extrait de moût ».
- Addition sur la phase supérieure de 20 ml de CHCl_3 , agitation pendant 10 minutes puis décantation 10 minutes.
- Récupération de la phase inférieure et la mettre dans l'erlen « Phase Chloroformique ».
- Répéter les deux dernières opérations.

c- Concentration de l'extrait final :

- Evaporation de la « Phase Chloroformique » au rotavapor.
- Resuspension dans 1.5 ml de méthanol.
- Le méthanol est filtré dans un vial d' HPLC sur un filtre 0.2 μm préconditionné par 1ml de méthanol.
- Le filtre est rincé avec 500 μl de méthanol et l'ensemble du volume de méthanol (1.5 ml filtrés et lavage de 500 μl) est séché sous flux d'azote. On fait ajouter après un volume de 500 μl de méthanol.

II-4.3.2 Dosage de l'AFB1 par HPLC-FLD

La méthode de détection de l'AFB1 par HPLC a été inspirée de Chan *et al.*, (2004). L'appareil HPLC permet une détection par fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 364 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$) et par UV ($\lambda = 225 \text{ nm}$ et 362 nm). La colonne analytique utilisée est de type Uptisphère 5 μm C18 ODB (150 x 4,6 mm) conditionnée à 25°C avec une pré-colonne de garde de 10 x 4 mm. Un volume de 80 μl a été injecté en utilisant un auto-injecteur (BIO-TEK, Milan, Italy). La phase mobile est constituée d'un mélange d'acide phosphorique 0.1% (A) et du méthanol/acetonitrile (50:50) (B) à un débit de 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Le temps de rétention était alors de l'ordre de 6 minutes.

II-5. Etude et caractérisation de la microflore fongique de raisins :

Ce travail consiste à identifier les populations fongiques parasitant les baies de raisins au vignoble et à étudier leur évolution. Les baies échantillonnées appartiennent à différents cépages et proviennent de 7 régions libanaises différentes choisies en fonction de leur situation géographique (voir Figure 22).

La première campagne de prélèvement des grappes a été réalisée entre Juillet et octobre de l'année 2004. Elle a porté sur plusieurs terroirs et sur plusieurs cépages durant deux stades de maturation : la véraison et la vendange (à maturité). Une deuxième campagne a été effectuée de la même manière (même protocole) sur la même période de l'année 2005.

II-5.1 Echantillonnage des grappes de raisins :

Afin de prendre des échantillons représentatifs des différents vignobles, une parcelle de chaque vignoble est découpée en dix zones (Voir Figure 24). Pour chaque zone, une grappe sera prélevée au hasard au centre de la plante. Les échantillons sont enfermés dans des sacs plastiques refroidis (eau glacée : en essayant de garder la température la plus proche possible de 4°C). Ces échantillons maintenus à froid sont acheminés au laboratoire dans les plus brefs délais pour l'analyse.

Le but est de caractériser la microflore fongique soit les différentes espèces de champignons présentes sur les grains de raisin, et de déterminer le pouvoir de production d'OTA et d'AFB1 de cette microflore.

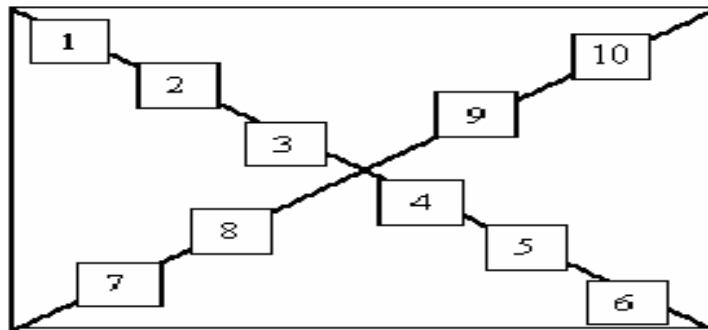


Figure 24: représentation des zones de prélèvements (carrés) des grappes de raisin sur une parcelle
(Commission Européenne, troisième forum d'OTA, 2004)

II-5.2 Isolement et identification de la microflore fongique :

a- Isolement :

À la réception des raisins au laboratoire, cinq baies sont prélevées au hasard de chacune des grappes et sont déposées stérilement sur une boîte de Pétri contenant un milieu gélosé d'isolement : **Dichloran Rose Bengal Chloramphénicol Agar (DRBC)**.

Ces boîtes de Pétri ensemencées sont alors incubées à 25°C pendant sept jours. Le Rose bengal qui entre dans la composition du DRBC a pour but de ralentir la croissance des champignons exubérants. En effet, certains champignons tels que *Mucor spp.* et *Rhizopus spp.* envahissent rapidement le milieu d'isolement et gênent la croissance des autres espèces fongiques. De plus l'addition du chloramphénicol permet d'éviter la contamination bactérienne.

Parmi les champignons en croissance, les moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium* (seuls genres potentiellement producteurs) sont repérées visuellement à la surface de la gélose par leur forme et leur couleur caractéristiques. Seuls ces champignons sont alors repiqués sur un milieu de purification : **Czapek Dox Agar (CZ)** et incubés pendant 7 jours à 25°C.

b- Identification :

L'observation des colonies des champignons qui se sont développés se fait tout d'abord à l'oeil nu puis à la loupe binoculaire dans le but de déterminer s'il s'agit d'un *Aspergillus*, d'un *Penicillium*, ou d'un autre genre en fonction de l'aspect morphologique macroscopique.

b-1. Descriptif des champignons appartenant au genre *Aspergillus*

Les champignons du genre *Aspergillus* se caractérisent par des colonies mycéliennes poudreuses qui atteignent 2 à 3 cm de diamètre après 5-7 jours d'incubation. Les teintes diffèrent selon les espèces. Les caractéristiques des différentes espèces isolées sont décrites dans les paragraphes à suivre (b-1.1 et b-1.2). Les conidiophores sont érigés, renflés à leur extrémité en une tête sphérique ou ovoïde. Suivant l'espèce, une ou deux rangées de stérigmates prend naissance sur les têtes. Sur ces stérigmates se forment et s'accumulent les spores en de très longues chaînes.

b-1.1 Le groupe des *Aspergillus nigri*

Les espèces appartenant au groupe des *Aspergillus nigri* ou *Aspergillus* noirs qui ont été isolées sont les suivantes :

- *A. niger aggregates*
- *A. carbonarius*
- *A. japonicus* (unisériée)

Elles sont caractérisées par des colonies de couleur brun foncé à noir.

L'identification de ces espèces se fait par observation des colonies après croissance sur du milieu *Czapek Yeast Agar (CYA)*. L'observation se fait d'abord à l'œil nu suivie d'une observation à la loupe binoculaire (grossissement $\times 50$) puis sur une préparation entre lame et lamelle au microscope (grossissement $\times 100$, $\times 400$, $\times 1000$).

Pour élaborer les préparations microscopiques, on ajoute une goutte de Tween 0.1% (Tween, type 80, *Fisher*) sur une lame grâce à une pipette *Pasteur*. Sur les boîtes de culture, les parties fongiques les plus jeunes qui se trouvent au bord de la colonie (une culture de 2 à 3 jours) sont prélevées grâce à une aiguille stérile. Ensuite les parties isolées sont disposées sur la lame et mélangées avec le tween 80. On pose ensuite la lamelle dessus et on observe les préparations au microscope. Les caractères morphologiques de chaque espèce sont décrits dans le tableau 13.

Tableau 13: Caractères morphologiques des espèces d'*Aspergillus nigri*

		<i>A. niger aggregates</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. japonicus</i>	
Loupe	Couleur des colonies	Noir		Brun foncé	
	Forme des têtes	Rondes, assez lisses	Eclatées, + ou - rondes	Rondes, assez lisses	
	Stipes	3 mm, lisses	5 mm, fragiles	1 mm, lisses	
Microscope	Têtes	Globuleuses et bisériées		Allongées et unisériées	
	Phialides	Fines, longues et de même taille	Epaisses et plus courtes	Epaisses et très courtes	
	Conidies	Taille et forme	4 à 5 μm , sphériques	7 à 10 μm , sphériques	2,5 à 3 μm , sphériques
		Ornementation	Verruqueuses	Echinulées	

b-1.2 Le groupe des *Aspergillus flavi*

Les espèces aflatoxinogènes appartenant au groupe des *Aspergillus flavi* qui ont été isolées sont les suivantes :

- *A. flavus* (généralement bisériée).
- *A. parasiticus* (généralement unisériée).

Elles sont caractérisées par des colonies de couleur verte jaune à vert foncé.

L'isolement ainsi que l'identification ont été faites suivant la même procédure décrite précédemment (b-1.1). Les caractères morphologiques de chaque espèce sont résumés dans le tableau 14.

Tableau 14: Caractères morphologiques des espèces d'*Aspergillus flavi*

Espèces	Tête conidienne	Présence de sclérotés	Diamètre des conidies (µm)	Formes et ornementation des conidies	Conidiophore
<i>A. flavus</i>	Unisériée et bisériée	Production par certains isolats	3.5-4.5µm	Globuleuses échinulées	400-1000µm à paroi échinulée
<i>A. parasiticus</i>	Unisériée	Occasionnellement	4-6µm	sphériques	250-500µm à paroi échinulée

b-2. Descriptif des champignons appartenant au genre *Penicillium*

Le genre *Penicillium* est facilement reconnaissable à l'œil nu ou à la loupe tout d'abord par sa teinte verte ou bleutée puis par ses caractéristiques morphologiques. En effet, il est caractérisé par des conidiophores (ou stipes) qui s'élèvent un à un du mycélium portant des phialides groupées en pinceaux au bout desquels les spores s'accumulent en chaîne.

Les colonies mycéliennes sont généralement peu développées, 2 à 5 cm de diamètre après 5-7 jours de culture. Les spores sont nombreuses, claires ou faiblement colorées, sphériques ou ovales, lisses ou échinulées.

Comme l'identification des nombreuses espèces de *Penicillium* est très délicate, nous nous limiterons à l'appartenance au genre.

c-Criblages des isolats producteurs d'OTA et d'AFB1

Pour tester la capacité de production d'OTA et d'AFB1, les isolats sont cultivés sur du milieu **Czapek Yeast Agar** (CYA). Ce milieu est optimum pour la production d'OTA par les

moisissures (Bragulat *et al.*, 2001). En effet, les moisissures puisent dans ce milieu tous les nutriments nécessaires à la synthèse des métabolites toxiques dont l'OTA et l'AFB1.

L'extraction de l'OTA et de l'AFB1 produites est réalisée par ajout de méthanol et le dosage est effectué en HPLC selon le protocole suivant.

c-1. Extraction de l'OTA et de l'AFB1

Culture de l'isolat sur milieu gélosé CYA (10 ml) pendant 7 jours à 25°C

Prélèvement de trois carottes de milieu colonisé par le champignon à l'emporte-pièce (ø 8 mm) (Le volume de milieu gélosé est le même dans toutes les boîtes).

Dépôt des trois carottes dans un tube Eppendorf et addition d'1ml de méthanol qualité HPLC.

- Ecrasement de la gélose et incubation pendant 1 heure à température ambiante.
- Centrifugation 10 min. à 13000 rpm (3 fois)
- Filtration du surnageant à l'aide d'une seringue (1 ml) et d'un filtre de 0.45 µm résistant aux solvants et adapté pour seringues (unités de filtration Millex 4 mm, Millipore)
- Récupération du filtrat dans un flacon HPLC (flacons ø 15 x 45 mm à visser et bouchons à vis avec septum PTFE/silicone, ICS).

Cette méthode facile et rapide permet de préparer un grand nombre d'échantillons en peu de temps, ce qui évite leur dégradation entre le moment où ils sortent de l'étuve et le moment où ils sont traités.

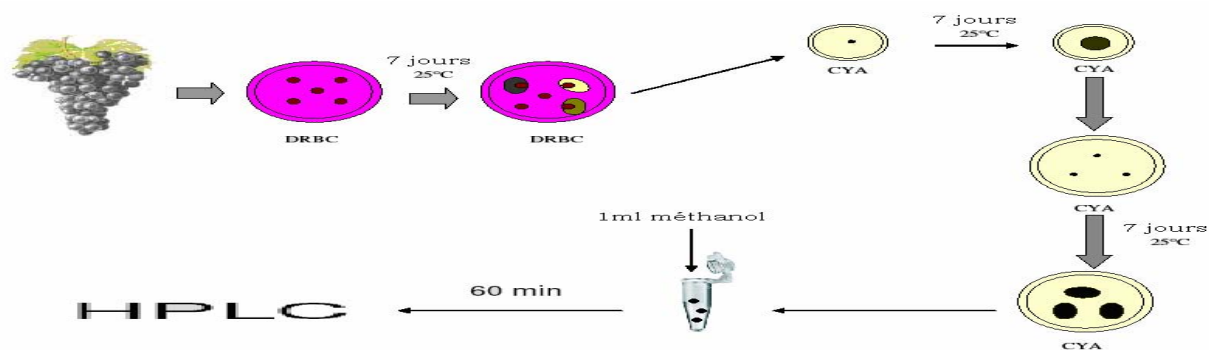


Figure 25: représentation schématique de la procédure expérimentale allant de la grappe de raisin passant par l'isolement et l'identification des espèces productrices de mycotoxines arrivant à l'étude du pouvoir producteur (Commission Européenne, troisième forum d'OTA, Bruxelles, Janvier 2004)

II-5.3 Etude de la croissance et de la production d'AFB1 sur milieu SGM par des souches aflatoxinogènes de la section *flavi*

La température et l'activité de l'eau (A_w) jouent un rôle primordial sur le développement des populations fongiques et par suite de leur toxinogénèse. Le but de cette expérimentation est donc d'étudier l'influence de ces deux facteurs environnementaux majeurs et de leurs interactions sur la vitesse de croissance de 3 souches aflatoxinogènes de la section *flavi* isolées des baies sur milieu SGM, milieu synthétique possédant presque les mêmes constituants du moût de raisin naturel.

Chaque facteur a été étudié à différents niveaux : 3 niveaux de température (18°C ; 30°C et 37°C) ainsi que 3 niveaux d'(A_w) (0.9 ; 0.95 ; 0.99) obtenues en utilisant des solutions de glycérol à différentes concentrations.

3 souches aflatoxinogènes de la section *flavi* ont été cultivées sur milieu CYA pH 6.7 à 30°C pendant 10 jours. Les conidies ont été récoltées par grattage dans une solution de Tween 80 à 0.04%. 10 µl d'une suspension à 10^5 de conidies/ml ont été déposés au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu SGM.

Le suivi de la croissance des souches a été effectué en mesurant chaque jour et sur 21 jours le diamètre de la colonie fongique. La régression linéaire de l'incrément du diamètre de la colonie par rapport au temps permet d'obtenir la vitesse de croissance apicale (mm/jour).

Le pouvoir producteur des souches a été estimé par du carottage à partir des colonies chaque 5 jours.

II-6. Caractérisation génétique des souches de la section *flavi*

Cette étude a été réalisée dans le but de caractériser génétiquement les souches appartenant à la section *flavi* surtout celles possédant une capacité aflatoxinogènes vu que la caractérisation morphologique de ces souches s'avère très difficile. Toutefois, cette caractérisation a été corrélée avec des caractéristiques morphologiques des souches isolées.

II-6.1 Extraction rapide de l'acide nucléique fongique (ADN)

Les molécules d'ADN sont libérées par la lyse de la paroi et de la membrane des cellules fongiques. L'ADN génomique est précipité par de l'isopropanol et resuspendu dans de 1x Tris-EDTA.

a- Solution de lyse:

L'extraction rapide d'ADN nécessite la préparation d'une solution de lyse dont la composition est donnée ci-dessous :

Tris HCl pH 8	400mM
EDTA pH 8	60 mM
NaCl	150mM
SDS	1 %
H ₂ O ultra pure	2ml

La solution est alors stérilisée par filtration sur un filtre 0.22 µm (Millipore).

b- Extraction d'ADN :

- Prendre une petite quantité de mycélium et ajouter 500µl de la solution de lyse dans un tube eppendorf de volume 1.5 ml, Puis mélanger et broyer le mycélium dans le tube et laisser reposer pour 10 minutes.
- Ajouter 150µl d'acétate de potassium (pH 4.8; solution préparée à partir de 60 ml d'une solution d'acétate de potassium 5 M, 11.5 ml acide acétique glacial et 28.5 ml d'eau milliQ).
- Vortexer le tube rapidement puis centrifuger pour 1 minute à 10 000 rpm.
- Transférer le surnageant dans un autre tube de 1.5 ml sur lequel un volume égal d'isopropanol est ajouté.
- Inverser le contenu plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une émulsion. Centrifuger 2 minutes à 10 000 rpm. Après centrifugation le supernageant est éliminé.
- Laver l'ADN obtenu avec 300 µl d'éthanol 70%. Une centrifugation pour 1 minute à 10 000 rpm sera effectuée puis le supernageant sera éliminé.
- Laisser sécher le tube à l'air libre sous une hotte.
- Ajouter dans le tube contenant l'ADN 50µl 1x Tris-EDTA et conserver pour l'utilisation.

II-6.2 La PCR (Polymerase Chain Reaction)

Pour l'amplification des gènes recherchés, les trois étapes d'un cycle de PCR se déroulent à des températures précises dans un thermocycleur (Robocycler gradient 96 Stratagene). Le thermocycleur est un système aprogrammable qui permet le passage d'une température à l'autre et la répétition du cycle automatiquement.

a- Protocole :

Un kit invitrogen est utilisé pour la préparation du mélange réactionnel. Ce kit est composé d'une enzyme, la *Taq* DNA polymerase, d'un tampon et du $MgCl_2$. Le mélange réactionnel est composé de :

amorce 1 (50 μ M)	1 μ l
amorce 2 (50 μ M)	1 μ l
dNTP (10 mM chacun)	1 μ l
$MgCl_2$ (25mM)	1.5 μ l
Tampon 10 X PCR	5 μ l
<i>Taq</i> DNA polymerase 5U/ μ l	0.5 unité
ADN	~ 200 ng
H ₂ O stérile	qsp 50 μ l

Les amorces utilisées sont indiquées dans l'Annexe (Anx I)

La PCR est programmée comme suit :

Première étape	Dénaturation 94 °C pendant 4 min.
Deuxième étape : 35 cycles	Dénaturation 94 °C pendant 45 sec. Hybridation T °C pendant 45 sec. Elongation 72 °C pendant t min. (T dépend de l'amorce) (t dépend de la taille du fragment à amplifier)
Troisième étape	Elongation 72 °C pendant 10 min.

Une fois la PCR est terminée le produit de la réaction est analysé par électrophorèse.

II-6.3 Electrophorèse sur gel d'agarose

Grâce au champ électrique présent dans la cuve d'électrophorèse horizontale, les acides nucléiques se déplacent au travers les mailles du gel d'agarose. La séparation se fait en fonction de la taille et du niveau d'encombrement des acides nucléiques, de la concentration du gel d'agarose, du voltage et de la force ionique du tampon.

a- Préparation du gel et migration

Le tampon utilisé pour la migration et la préparation du gel est du TAE 1X : Tris-Acétate, EDTA (acide Diamine Ethylène-Tétra-Acétique). Les sels contenus dans ce tampon permettent la conduction du champ électrique dans la cuve d'électrophorèse horizontale. Nous utilisons un gel à 0.8 % d'agarose. L'agarose en poudre est porté à ébullition au four à micro-onde dans du tampon TAE 1 X. Puis 2 µl de BET sont ajoutés. Les échantillons sont alourdis par un tampon de charge « Blue/Orange Loading Dye, 6X » (Promega) et sont déposés dans les puits du gel d'agarose immergé dans du tampon TAE 1X. Le marqueur de taille:1Kb DNA Ladder (Promega) sert de référence pour estimer la taille des fragments d'acides nucléiques.

b- Analyse du gel

Le BET est un agent mutagène qui s'intercale entre les bases des acides nucléiques. Il permet de visualiser les bandes par sa fluorescence sous UV (254 nm). Le BET doit être utilisé avec beaucoup de précaution, il est hautement cancérigène. Après migration, le gel est analysé par l'utilisation d'un trans-illuminateur (table UV).

III- Résultats et Discussion

III-1. Etat de lieux des vins libanais

Dès 1996, l'OTA a été détectée dans plusieurs échantillons de vin à travers le monde et les études se sont dès lors enchaînées pour mieux localiser le problème et déterminer les niveaux de contamination. Le contenu d'OTA a été évalué dans les moûts, vins, jus de raisin et raisin secs. Cette mycotoxine a été rencontrée à des quantités plus ou moins importantes selon les origines des produits analysés (Bejaoui *et al.*, 2006 ; Zimmerli et Dick, 1996 ; Visconti *et al.*, 1999 ; Castellari *et al.*, 2000 ; Markaki *et al.*, 2001 ; Otteneder et Majerus, 2000 ; Cabanes *et al.*, 2002 ; Stefanaki *et al.*, 2003 ; Shephard *et al.*, 2003).

La présence de l'OTA dans la filière raisin constitue donc un sérieux problème à la fois économique et sanitaire surtout dans les pays du bassin Méditerranéen, pays dans lesquels de hauts niveaux de contamination ont été rapportés (Bejaoui *et al.*, 2006 ; Zimmerli et Dick, 1996 ; Visconti *et al.*, 1999 ; Castellari *et al.*, 2000 ; Markaki *et al.*, 2001 ; Otteneder et Majerus, 2000 ; Cabanes *et al.*, 2002 ; Stefanaki *et al.*, 2003 ; Shephard *et al.*, 2003). Cependant, aucune étude jusqu'à cette date n'a été effectuée sur les vins Libanais concernant la présence ou l'absence de cette mycotoxine. Cette première étape vise donc à établir l'état des lieux des vins finis Libanais dans le but d'estimer le taux de leur contamination par l'OTA.

Dans ce but, 90 échantillons de vins finis dont 70 échantillons de vins rouges et 20 échantillons de vins blancs (de l'année 1996 à 2003) ont été testés dans un premier temps par la technique ELISA. Vu les interférences que peuvent avoir les autres constituants du raisin sur la quantification de l'OTA, cette technique a été utilisée alors comme un premier criblage.

Les résultats obtenus ont montré que 90% des échantillons de vins rouges ont été contaminés à des taux allant de 4 jusqu'au 25µg/L. Concernant les vins blancs, 20% des échantillons ont montré une contamination à des niveaux allant de 1.5 jusqu'au 9µg/L.

Vu les résultats obtenus et qui ont montré de très hauts niveaux de contamination de vins finis par l'OTA et vu que le test ELISA est considéré comme test de criblage qualitatif, les

même échantillons de vins ont été testés par HPLC-FLD qui s'avère le test quantitatif et spécifique le plus adapté au dosage de cette mycotoxine. Toutefois le dosage de l'OTA par HPLC-FLD a été précédé par une extraction de cette mycotoxine des vins à l'aide de colonne d'immunoaffinité (IAC) selon la norme Européenne (EN 14133, V 03-128).

Les résultats obtenus ont montré que 42 échantillons (60%) des vins rouges finis ont été faiblement contaminés par l'OTA à des niveaux allant de 0.012 à 0.126µg/L alors que 3 échantillons (15%) de vins blancs ont montré des taux de contamination allant de 0.017 à 0.06 µg/L (tableau 15). dans tous les cas, les niveaux de contamination obtenus étaient bien en dessous de la norme internationale fixée à 2 µg/L.

Tableau 15 : Taux de contamination des vins finis par l'OTA

Taux de concentration µg OTA L ⁻¹	Concentration maximale µg OTA L ⁻¹ [Vins rouges]	Vins rouges nbre totale des échantillons	Concentration maximale µg OTA L ⁻¹ [Vins blancs]	Vins blanc nbre totale des échantillons
0.1-0.5	0.126	2	-	-
<0.05-0.1	0.088	7	0.06	1
0.01-0.05	0.048	33	0.017	2
<LD ^a	-	28	-	17

LD^a: Limite de détection

Toutefois le pourcentage élevé des échantillons des vins rouges comparé aux blancs peut être attribué au procédé de vinification. En effet, comme il a été expliqué précédemment, la vinification en rouge fait intervenir une étape de macération pelliculaire avant et pendant la fermentation alcoolique alors qu'elle est relativement courte pour le rosé et totalement exclue pour la vinification en blanc. Deux hypothèses plausibles ont été émises pour expliquer le rôle de la macération dans l'augmentation de la contamination à l'OTA. La première plaide pour un développement fongique et une production de la toxine durant les premiers moments de la macération (en cas de température favorable et conditions aérobies (Brera *et al.*, 2004) et avant le déclenchement de la phase de fermentation anaérobique (Höhler, 1998), la deuxième suppose une augmentation des teneurs en OTA due à sa solubilisation des grains vers le jus sous l'action de l'alcool qui assure son extractibilité (Lataste *et al.*, 2003).

D'après les résultats obtenus et vu la contamination en OTA de 60% des échantillons de vins rouges même à faible taux, une étape préliminaire s'avère nécessaire. Il s'agit de l'étude de la microflore fongique contaminant les vignobles et responsable de la production de cette mycotoxine sur les baies et par suite la contamination des vins.

III-2. Description de la population fongique totale

Cette étude a été conduite dans le but d'isoler et d'identifier la microflore fongique qui contamine les vignobles au Liban. Afin de caractériser cette mycoflore et d'étudier sa dynamique, deux stades de développement de raisin : la véraison et la vendange ont été choisis durant lesquels l'échantillonnage a été réalisé. Au cours de ce travail, 28 parcelles ont été choisies qui sont localisées dans 7 régions vitivinicoles libanaises appartenant à la plaine de la Békaa qui contient 70 % des vignobles libanais. Les échantillons de raisin ont été collectés sur 2 campagnes successives (2004-2005).

A partir de 10 grappes collectées sur chaque parcelle, les champignons appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* ont été isolés, dénombrés, identifiés et conservés. Leur potentiel mycotoxinogène (OTA et AFB1) a été testé in vitro en utilisant le milieu (CYA) et les teneurs en OTA et AFB1 dans les moûts dérivés des grappes cueillies ont été déterminées.

Pendant les deux campagnes successives de collecte, une population de 1069 isolats a été récupérée à partir des raisins des parcelles étudiées. Cette population s'est répartie comme suit : 559 isolats récupérés en 2004 et 510 isolats en 2005.

- Le genre *Penicillium* et indépendamment des années était toujours minoritaire comparé au genre *Aspergillus*. Son taux était de 10.9 % en 2004 et a chuté à 4.5 % en 2005 (figure 26). Cette population ne produisant pas d'OTA et donc ne représentant aucun danger sanitaire dans la filière vin, son identification et caractérisation n'étaient pas nécessaires.
- Le genre *Aspergillus* était fortement plus marqué, son pourcentage d'incidence était de 89.1 % en 2004 passant à 95.5 % en 2005 (figure 26). Parmi les isolats de ce genre la section *Nigri* restait dominante avec des pourcentages d'incidence de 87.3 % et 56.9 %

respectivement en 2004 et 2005. Cette section était constituée à partir des 3 groupes suivants : *A. carbonarius*, *A. niger* agrégats (qui peut comprendre jusqu'à 7 ou 8 espèces différentes) et *A. japonicus*. Alors qu'*A. carbonarius* était toujours l'espèce minoritaire par rapport aux 2 autres groupes, *A. niger* agrégats s'avère le groupe fortement dominant quelle que soit l'année. La deuxième section représentant le genre *Aspergillus* fut la section *flavi* avec des pourcentages d'incidence de 12.7 % en 2004 passant à 43.1 % en 2005 (figure 27).

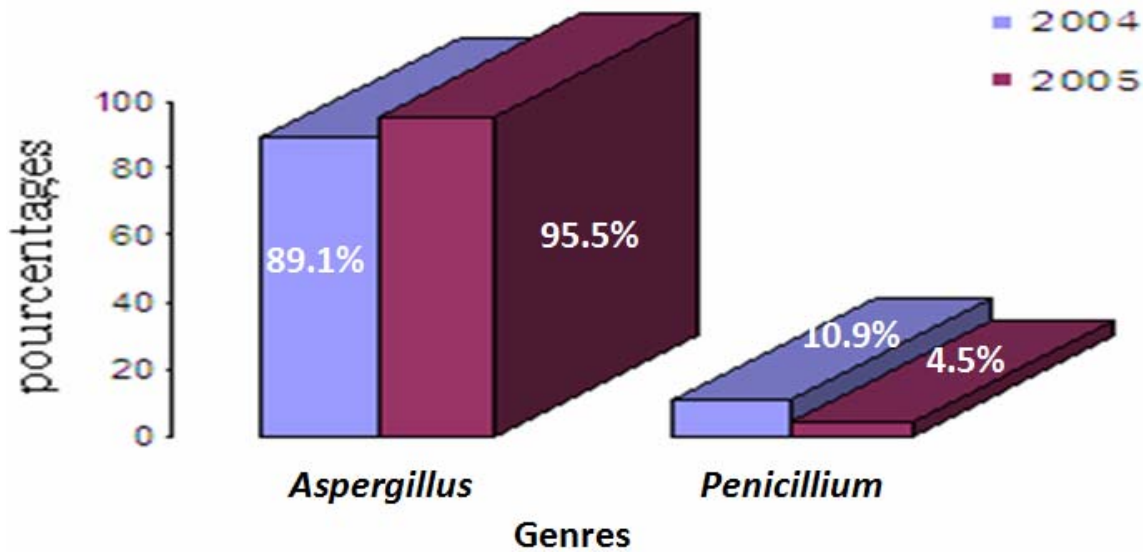


Figure 26 : Répartition des deux genres isolés *Aspergillus* et *Penicillium* sur les deux années d'études

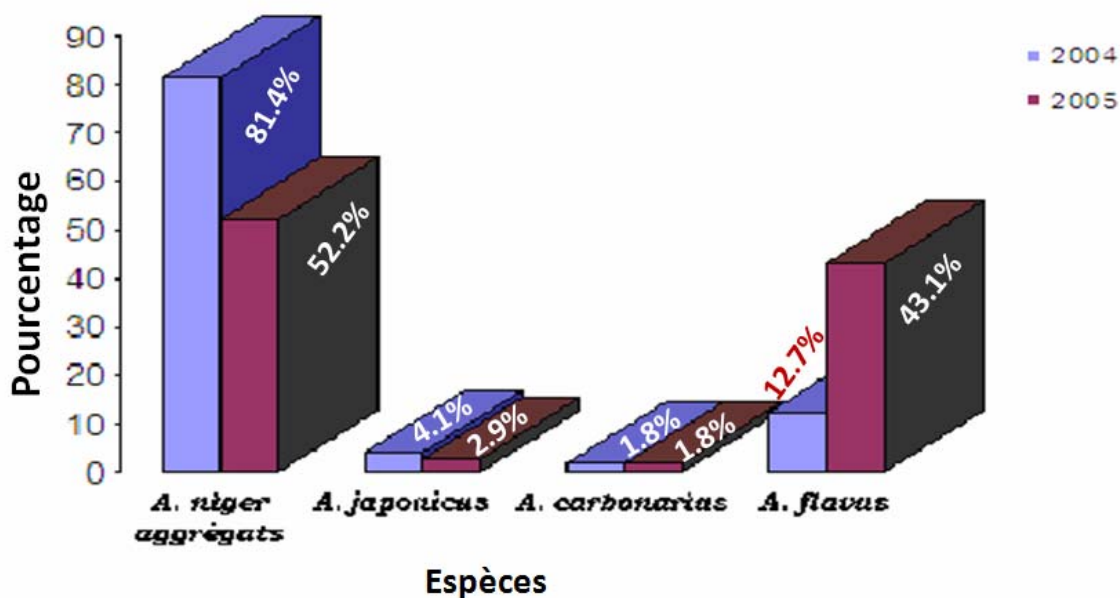


Figure 27 : Répartition des espèces du genre *Aspergillus* sur les deux années d'études

III-3. Description des populations fongiques mycotoxinogènes

Le pouvoir toxigène des souches isolées sur les deux années a été testé sur milieu CYA dans le but d'estimer le pouvoir de production de ces souches aux vignobles.

Concernant le pouvoir ochratoxinogène, aucune des 83 souches de *Penicillium* isolées au cours de cette étude n'a présenté un pouvoir de production détectable de cette mycotoxine.

Cependant, des 986 souches du genre *Aspergillus*, 18 ont montré une capacité ochratoxinogène, à noter que ces 18 souches appartenaient à l'espèce *A. carbonarius* et qu'aucune des autres souches isolées n'a présenté une capacité de production de cette toxine à des limites détectables.

Concernant le pouvoir aflatoxinogène, 119 isolats appartenant à la section *flavi* ont montré un caractère aflatoxinogène alors qu'aucune des autres souches isolées de la section *Nigri* ni celles du genre *Penicillium* n'a présenté un pouvoir aflatoxinogène détectable.

La taille (nombre d'isolats collectés à la surface des baies), l'incidence (pourcentage des isolats producteurs au sein du même groupe) et le potentiel mycotoxinogène au sein des espèces sont 3 facteurs déterminants pour juger de leur importance en tant que producteur de mycotoxine, Ils sont représentés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Incidence et potentiel mycotoxinogènes au sein des isolats fongiques au cours de l'étude

Isolats	Nombre d'isolats	Incidence ochratoxinogène	Potentiel ochratoxinogène (µg/g CYA)	Incidence aflatoxinogène	Potentiel aflatoxinogène (µg/g CYA)
<i>A. carbonarius</i>	18	100%	[4-52.8]	0%	0
<i>A. niger</i> <i>aggrégats</i>	652	0	0	0	0
<i>A. japonicus</i>	34	0%	0	0	0
<i>A. flavi</i>	282	0%	0	44.3%	[10-40]
<i>Penicillium</i>	83	0%	0	0	0

III-4. Evolution des populations fongiques totales et mycotoxinogènes

III-4.1 Selon le stade de maturité

Indépendamment des années, il a été remarqué que l'évolution de la population fongique totale était croissante en allant de la véraison à la vendange. En effet, la plus importante contamination fongique était remarquée au dernier stade de maturité, stade auquel 62% des champignons totaux, 72% des isolats ochratoxinogènes et 86% des isolats aflatoxinogènes ont été isolés (Figure 28).

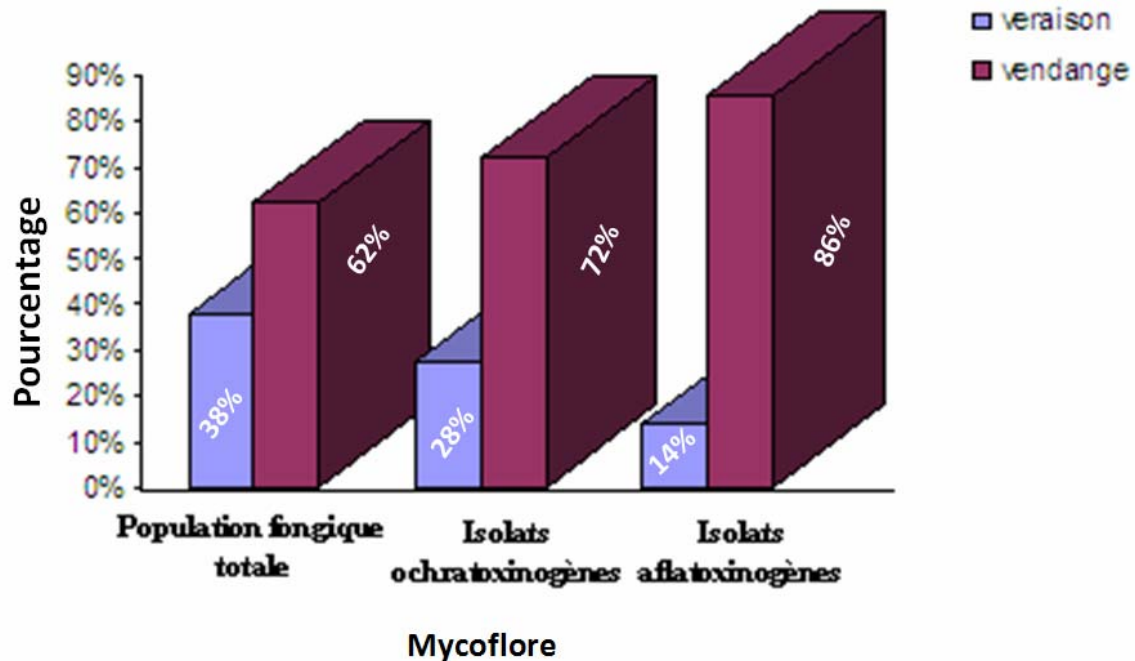


Figure 28 : Evolution de la population fongique totale et mycotoxigène en fonction du stade de maturité au cours de l'étude

III-4.2 Selon les régions

a- Contexte géographique et climatique

D'une altitude moyenne de 900m, la Békaa se trouve située dans la partie orientale du Liban. Cette plaine s'étend sur 120 Km et sur une largeur de 8 à 14 Km. Le climat de cette plaine varie du continental sec dans la partie centrale-sud au sub-désertique à l'extrême nord avec une insolation très forte. La température moyenne varie entre 25 à 33°C. Les précipitations dans cette région varient de 800 mm dans le sud de la Békaa, 600 mm dans la Békaa centrale à moins de 200 mm à l'extrême « nord-est » de la plaine. Concernant l'humidité relative, les valeurs en hiver sont plutôt élevées (environ 80%) mais elles diminuent nettement en été pour atteindre la valeur moyenne de 35 à 48% surtout au nord de la plaine.

Les 7 différentes régions des vignobles concernées par notre étude se situent au niveau de la partie centrale de cette plaine et s'étendent vers le sud de la Békaa (Figure 29) où se trouvent localisés les 70% des vignobles libanais, donc elles appartiennent en général à la même région géographique et sont soumises aux mêmes conditions climatiques.

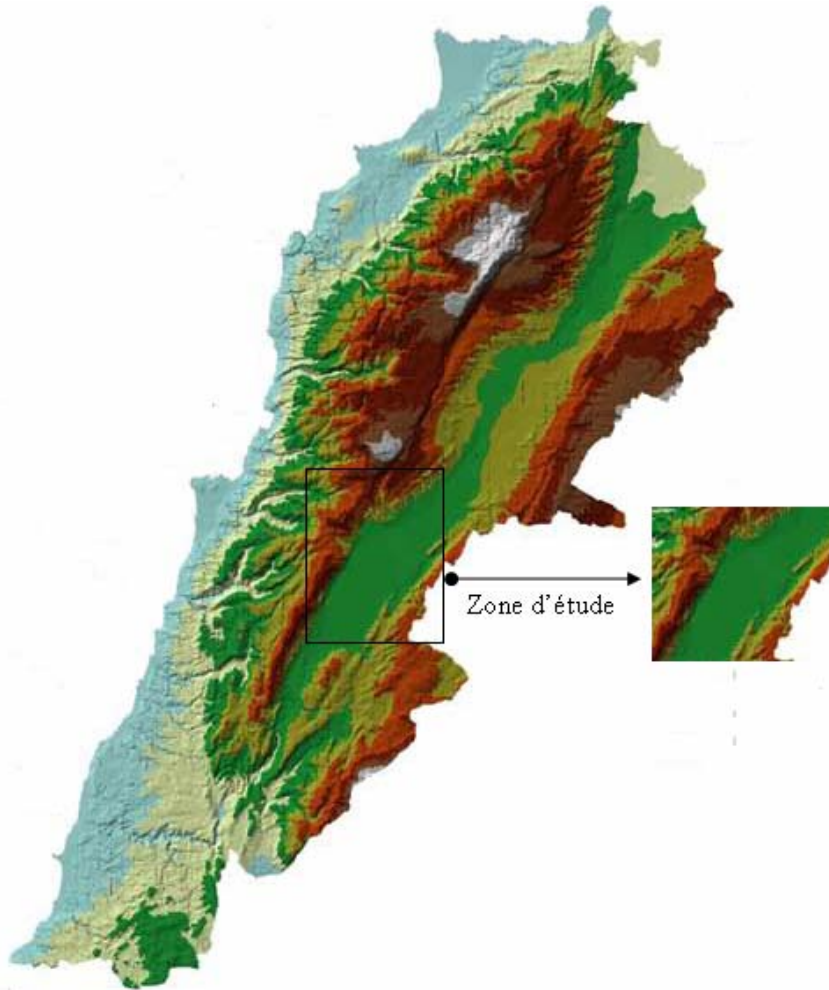


Figure 29 : Zone des vignobles concernés par l'étude

Tout au long de notre étude, les relevés journaliers de température, d'humidité relative et de pluviométrie entre le mois de Mai et le mois de Septembre, ont été enregistrés (Station de Taanayel).

Les données représentées dans la figure 30 constituent des données moyennes caractérisant la région centrale de la Békaa où sont localisés les vignobles concernés pour les deux années de l'étude : 2004 et 2005.

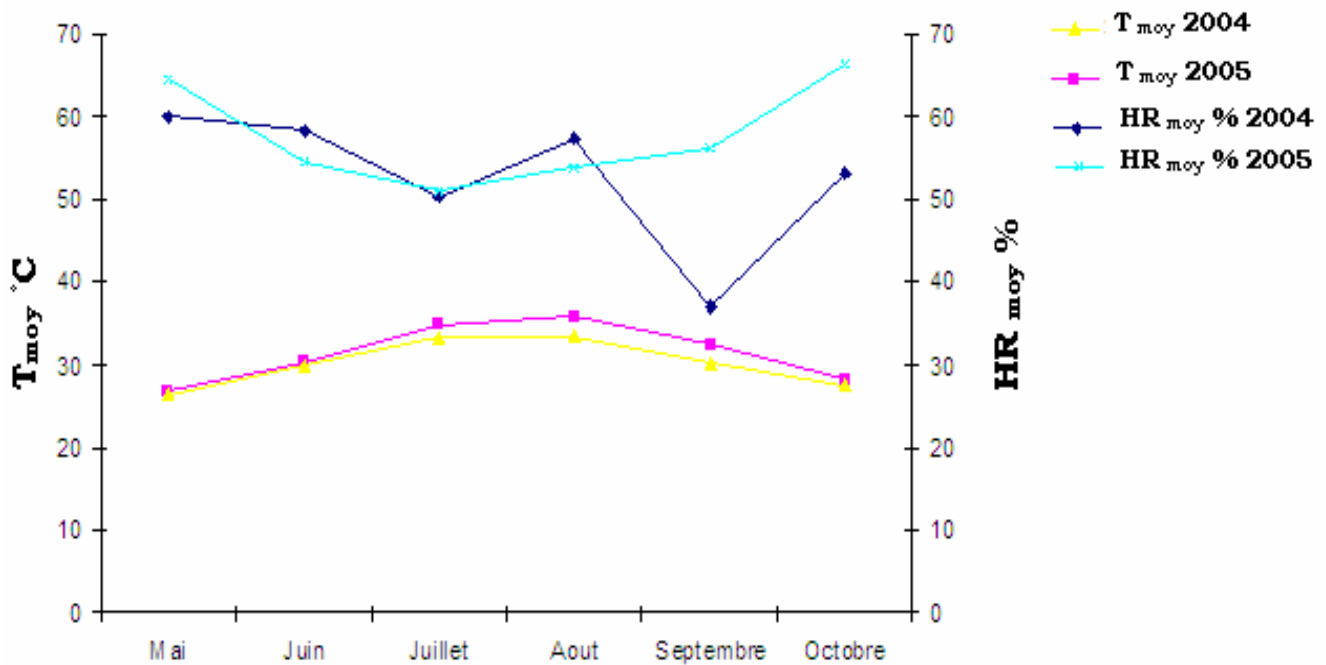


Figure 30 : Températures et humidités relatives moyennes de la région de la Békaa centrale pour les deux années 2004 et 2005. *T_{moy}* : Température moyenne ; *HR_{moy}* : Humidité relative moyenne.

b- Description de la population fongique totale

Quelle que soit l'année, le nombre total des isolats fongiques isolés des baies est presque similaire dans toutes les régions avec toutefois une augmentation de l'occurrence de ces isolats de la véraison à la vendange (Figure 31).

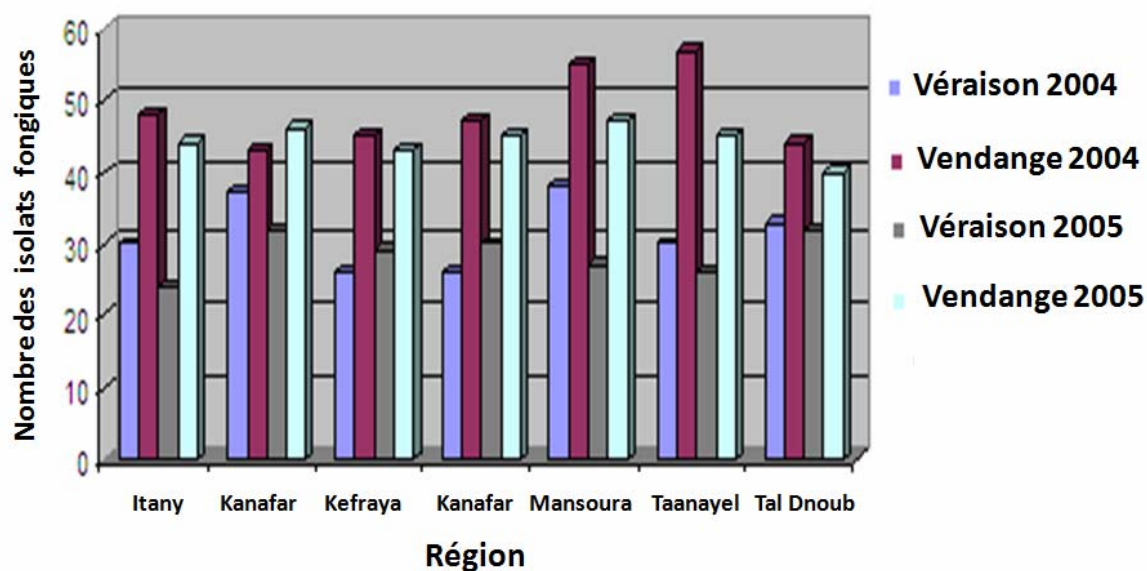


Figure 31 : Occurrence de la population fongique totale dans les régions concernées par l'étude durant les deux stades de maturation en 2004 et 2005

c- Description de la population fongique mycotoxinogène

Quelle que soit l'année, le nombre des isolats fongiques mycotoxinogènes isolés des baies est distribué d'une manière similaire entre les régions en augmentant toujours de la véraison à la vendange (Figure 32). Les petites différences qui existent entre ces régions ne s'avèrent pas représentatives, surtout au niveau des isolats ochratoxinogènes sachant que ces isolats étaient au nombre de 18 sur les deux années et pour toutes les régions. Toutefois, il est à noter que le nombre des isolats aflatoxinogènes a augmenté en 2005 en raison de l'augmentation du nombre total de la population fongique appartenant à la section *flavi* soit de 12.7% en 2004 à 43.1% en 2005.

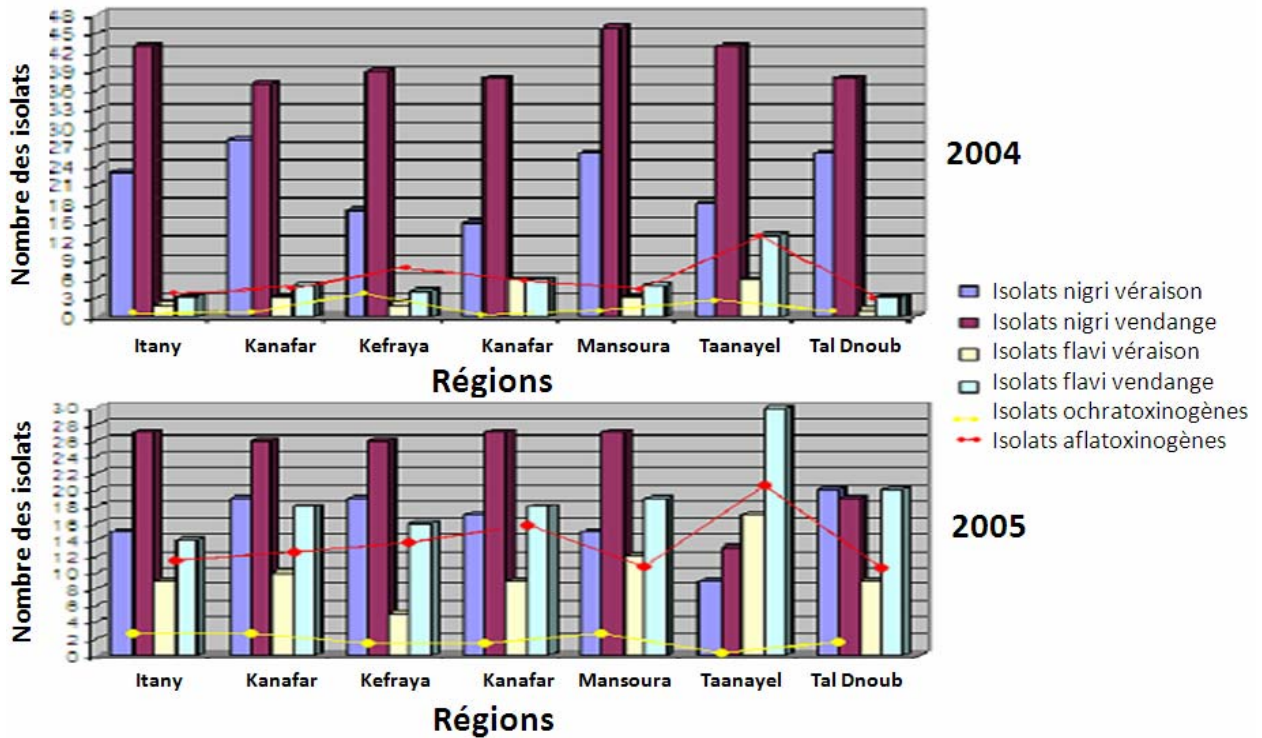


Figure 32 : Représentation du nombre des isolats mycotoxinogènes au sein du nombre total des isolats durant les années (a) : 2004 et (b) : 2005.

III-5. Teneurs en OTA et AFB1 dans les échantillons de moûts

Les tableaux (17 et 18) montrent les teneurs en OTA et en AFB1 des échantillons de moûts obtenus à partir des grappes collectées des vignobles durant les deux années de l'étude. Un nombre de 105 échantillons a été obtenu pour le dosage. Pour tous les échantillons, l'analyse a été réalisée après broyage des grappes et filtration pour l'élimination des grosses particules solides. A noter toutefois que le dosage de l'OTA a été précédé par une purification sur colonne IAC et que l'analyse a été effectuée en se basant sur la norme Européenne (EN 14133, V 03-128), alors que l'AFB1 a été extraite par méthode (liquide-liquide) suivant la technique développée par Molinié *et al.* (2005) et EL-Adlouni *et al.* (2006). La présence de chaque mycotoxine a été corrélée avec l'occurrence des souches toxigènes responsables isolées à partir des baies.

Tableau 17 : Occurrence d'*A. carbonarius* et d'*A. flavus* sur les grappes et présence d'OTA et d'AFB1 sur le moût dérivé en 2004

Vignoble	<i>A. carbonarius</i>		OTA		<i>A. flavus</i>		AFB1	
	Présence Véraison	Présence Vendange	Présence Véraison	Présence Vendange	Présence Véraison	Présence Vendange	Présence Véraison	Présence Vendange
1	-	+	-	-	+	+	-	+
2	-	+	+	+	+	+	+	+
3	-	-	-	+	-	+	-	+
4	-	-	+	+	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	+	-	+
6	-	-	+	-	+	-	+	+
7	-	***	+	***	-	***	+	***
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	+	+	-	-	-	-	+
10	-	***	-	***	-	***	-	***
11	-	***	-	***	-	***	+	***
12	-	+	+	+	+	+	+	+
13	-	-	-	-	+	+	+	-
14	-	-	-	-	+	+	+	-
15	+	+	-	+	-	-	+	-
16	-	***	-	***	-	***	-	***
17	-	-	+	+	+	+	-	+
18	+	-	-	+	+	+	+	+
19	+	-	+	+	-	-	-	-
20	-	***	+	***	-	***	-	***
21	-	+	+	-	-	-	-	-
22	-	-	+	+	-	-	-	+
23	-	-	-	+	+	+	+	+
24	-	***	+	***	-	***	-	***
25	-	***	+	***	+	***	+	***
26	-	-	+	+	+	+	-	+
27	-	-	+	+	+	+	-	-
28	-	-	-	-	-	+	-	-

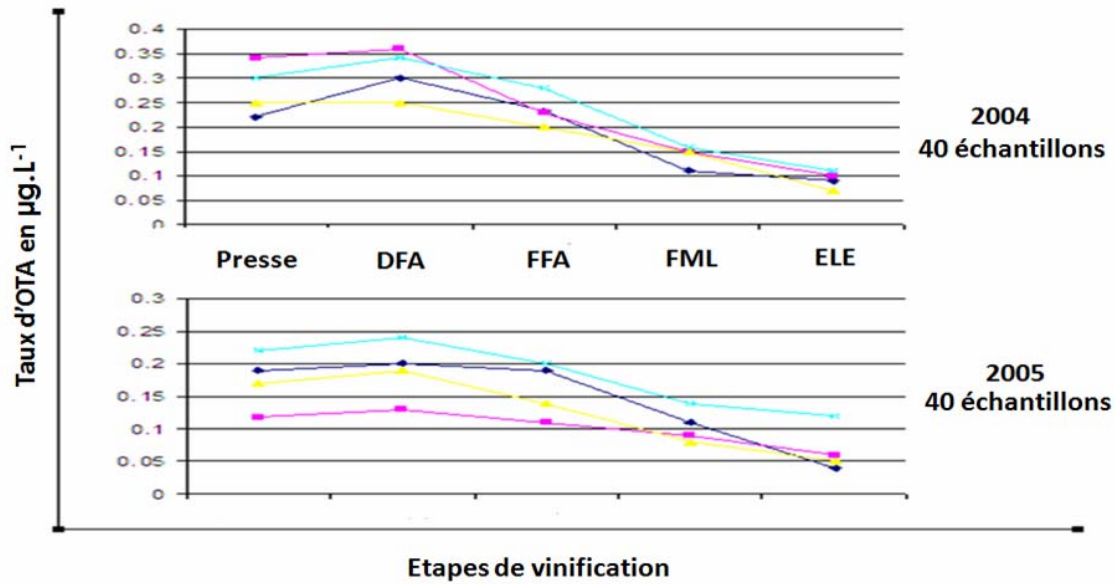
*** : Pas d'échantillonnage

Tableau 18 : Occurrence d'*A. carbonarius* et d'*A. flavus* sur les grappes et présence d'OTA et d'AFB1 sur le moût dérivé en 2005

Vignoble	Présence <i>A. carbonarius</i>		Présence OTA		Présence <i>A. flavus</i>		Présence AFB1	
	Véraison	Vendange	Véraison	Vendange	Véraison	Vendange	Véraison	Vendange
1	-	-	-	-	+	-	+	-
2	-	+	-	-	-	+	-	+
3	-	-	-	-	-	+	+	+
4	-	-	-	-	+	+	+	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	+	-	-	-	+	-	+
7	+	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	-	+
10	-	-	-	-	+	+	+	+
11	-	-	-	-	-	+	-	+
12	-	+	-	-	+	+	-	-
13	-	-	-	-	+	+	+	-
14	-	-	-	-	+	+	-	+
15	-	+	-	-	-	+	-	-
16	+	-	-	-	-	+	-	+
17	-	+	-	-	-	+	-	-
18	-	-	-	-	+	+	-	+
19	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	+	+	-	+
21	-	+	-	-	+	-	-	+
22	-	-	-	-	-	+	-	+
23	-	-	-	-	+	-	+	-
24	-	-	-	-	-	+	-	-
25	-	-	-	-	+	-	+	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	+	+	-	+
28	-	+	-	-	+	+	+	+

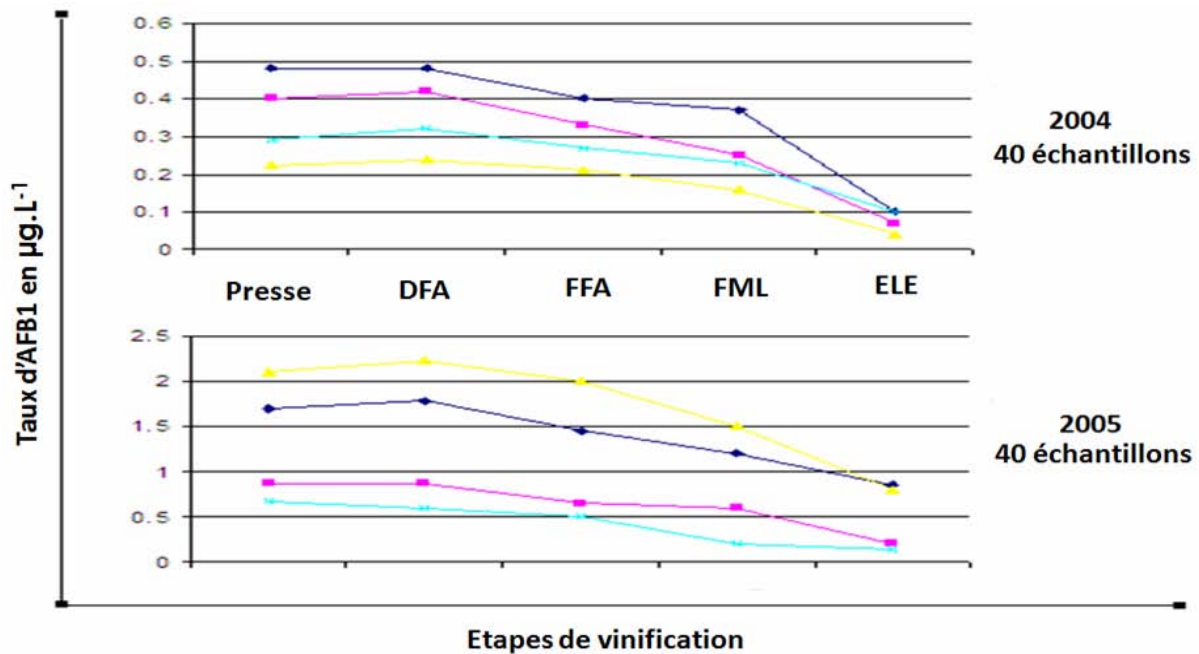
III-6. Evolution de la teneur en OTA et en AFB1 en fonction de différentes étapes de vinification

Dans le but de suivre l'évolution des taux d'OTA et d'AFB1 durant la vinification, 40 échantillons (2004 et 2005) ont été pris à partir de 5 différentes étapes qui sont : la presse, début de la fermentation alcoolique, fin de la fermentation alcoolique, la fermentation malolactique et élevage des vins. Les teneurs en OTA et en AFB1 ont été estimées par HPLC-FLD après extraction et purification de ces deux mycotoxines suivant les méthodes décrites dans le paragraphe précédent. Les résultats obtenus sont montrés dans les figures 33 et 34.



DFA: début fermentation alcoolique; **FFA:** fin fermentation alcoolique; **FML:** fermentation malo-lactique; **ELE:** élevage

Figure 33 : Evolution de la teneur en OTA de différents échantillons en fonction des différentes étapes de vinification A :(2004) ; B :(2005).



DFA: début fermentation alcoolique; **FFA:** fin fermentation alcoolique; **FML:** fermentation malo-lactique; **ELE:** élevage

Figure 34 : Evolution de la teneur en AFB1 de différents échantillons en fonction des différentes étapes de vinification A :(2004) ; B :(2005).

A l'issue de cette étude, différentes remarques peuvent être émises. Les vignobles libanais sont touchés par des champignons filamenteux des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Et, si les isolats du genre *Penicillium* n'ont montré aucune capacité toxigène, la situation n'est pas la même pour ceux du genre *Aspergillus*. Or, la nature de l'agent causal impliqué dans la contamination à l'OTA et l'AFB1 des vignobles libanais a été déterminée. Il s'agit principalement d'*Aspergillus carbonarius* de la section *Nigri* ; la seule espèce qui a montré *in vitro* une capacité ochratoxinogène et, d'*Aspergillus flavus* de la section *Flavi*, la seule espèce productrice de l'aflatoxine B1. Toutefois, l'occurrence de la microflore fongique totale et mycotoxinogène a augmenté en allant de la véraison à la vendange. Cette croissance de l'occurrence des champignons sur les baies, leur incidence et le potentiel mycotoxinogène des souches sont des éléments déterminants dans l'importance de la contamination des raisins. Ces propriétés sont à la fois déterminées par des facteurs internes liés à l'espèce fongique et à des facteurs externes liés à l'environnement. Parmi ces facteurs extrinsèques, les conditions physico-chimiques (température, humidité relative, disponibilité en eau, substrat) sont d'une importance capitale. Ces facteurs sont étroitement liés au climat en relation avec la situation géographique des vignobles mais aussi aux propriétés du substrat (dans ce cas les raisins), qui deviennent plus favorables pour les champignons pendant la vendange. Durant cette période, les baies de raisin présentent le maximum des sucres (glucose et fructose) constituant ainsi le substrat idéal pour le développement des champignons filamenteux et mycotoxinogènes, comparée à des stades antérieurs de développement.

Toutefois, les résultats obtenus concernant l'occurrence de la microflore fongique totale et mycotoxinogène, n'ont pas montré des différences significatives durant chaque année entre les 7 régions concernées par l'étude. Cette réalité peut être expliquée par le fait que ces 7 différentes régions appartiennent à une même situation géographique et climatique du fait des faibles distances (25 Km) séparant entre elles. De plus, les données climatiques collectées (Fig.30) n'ont montré presque aucune différence entre les régions en ce qui concerne la température moyenne et l'humidité relative moyenne, les deux facteurs jouant un rôle prépondérant sur la croissance et la physiologie des champignons. Une autre explication s'avère valable dans notre cas : les vignobles concernés par l'étude appartiennent tous à une même firme donc aux mêmes pratiques culturales (irrigation, pesticides utilisés,

vendange manuelle, mode de conduite, etc...) ce qui a comme effet de réduire l'influence de la variabilité des facteurs mis en œuvre dans chaque vignoble.

Cependant, d'autres facteurs peuvent également intervenir, interagir et générer certaines différences même au sein d'une même région comme le relief, les vents, le sol et le voisinage des vignobles. Ces facteurs peuvent agir indépendamment ou en synergie sur le taux de contamination des vignobles. Ceci s'est traduit dans notre cas par l'occurrence de la section *flavi* dans la région de Taanayel (Fig. 32) qui était la région la plus touchée par les espèces de cette section et celle à partir de laquelle le plus grand nombre des isolats aflatoxinogènes a été recueilli. Cette occurrence a été rapportée à la seule variable agissante dans ce cas et qui est le voisinage des vignobles dans cette région qui est caractérisée par la présence de plusieurs fermes d'espèces bovines. Or, l'entassement des produits végétaux qui servent à l'alimentation des animaux ainsi que les déjections de ces derniers constituent une piste non négligeable de l'origine de la contamination de son entourage.

Toutefois, il est important d'expliquer la différence d'occurrence en fonction des espèces entre les deux années. Or, en 2004, le pourcentage des espèces de la section *flavi* était de 12.7% alors qu'en 2005, ce pourcentage était de 43.1%. Puisque le travail a été effectué dans les mêmes régions, sur les mêmes parcelles de la même firme, la seule explication valable pour traiter la différence d'occurrence des espèces entre les deux années peut être reliée aux changements des conditions climatiques.

Si on compare les données météorologiques moyennes entre les deux années représentant le macroclimat de la région en générale, nous remarquons que les profils des températures moyennes des deux années sont presque similaires avec une T_{moy} de 32°C en 2004 et une T_{moy} de 30°C en 2005. Cependant, concernant l'humidité relative HR, une différence nette a été marquée, cette HR moyenne était de 52% en 2004 alors elle était de 59% en 2005.

Si la valeur moyenne générale de l'humidité relative (HR) n'est pas très significative, les valeurs moyennes de la (HR) de chaque année le sont. Or, en 2004 une (HR_{moy}) de 36% a caractérisé la région pendant les vendanges cependant, durant la même période en 2005 cette (HR_{moy}) était de 57% (Fig.30). Donc, le changement dans la valeur de la (HR_{moy}) surtout pendant la vendange durant laquelle l'occurrence des champignons est maximale, peut

expliquer la différence obtenue qui est traduit par la différence dans l'occurrence de la section *flavi* entre les deux années.

Concernant les teneurs des deux mycotoxines dans les échantillons de moûts et dans le cas d'OTA en particulier, le faible pourcentage d'*A. carbonarius* rencontré dans les vignobles est en parfaite corrélation avec la teneur de l'OTA analysée dans les moûts. D'une façon générale, l'OTA ne présente pas un danger dans les vignobles libanais car les champignons producteurs sont faiblement présents.

Cependant, les teneurs d'OTA obtenues dans les vins testés peuvent être expliquées par le fait qu'il se peut durant leurs années de fabrication, qu'une population ochratoxinogène importante ait touché les vignobles d'où l'importance du millésime. Vu que les conditions climatiques entre les années ne sont pas stables donc des modifications dans l'occurrence de la microflore fongique peuvent agir ce qui peut se traduire par la teneur en mycotoxine du produit dérivé.

En ce qui concerne l'AFB1, une corrélation existe entre l'occurrence des isolats aflatoxinogènes et la teneur en AFB1 dans les raisins quelle que soit l'année de l'étude.

A noter toutefois que l'absence de l'OTA des raisins collectés en 2005 peut être expliquée de deux manières : la première est liée aux très faibles pourcentages des souches ochratoxinogènes d'*A. carbonarius* isolées, et la deuxième peut être liée à la niche écologique des raisins, déterminant l'interaction entre la microflore fongique isolée durant cette année. Or, le pourcentage des isolats de la section *flavi* a augmenté jusqu'à 43.1 % alors qu'il était de 12.7% en 2004. Cela s'explique d'une part, par la compétition pour le substrat entre les isolats ochratoxinogènes et aflatoxinogènes et d'autre part, par le fait que les souches aflatoxinogènes peuvent dégrader l'OTA.

Enfin, les diminutions des taux d'OTA et d'AFB1 suivant les différentes étapes de vinification peuvent être expliquées par le fait que ces deux mycotoxines ont été adsorbées par les parois des levures de fermentation. Différentes études ont été réalisées dans le but de rechercher le devenir de l'OTA disparue. *Bejaoui et al.* (2004) ont rapporté que l'OTA a été adsorbée par les levures *S. cerevisiae* et *S. bayanus* alors aucun produit de dégradation de cette mycotoxine

n'a été détecté. De plus, ils ont rapporté que l'utilisation de ces mêmes levures après traitement à la chaleur montre une élimination instantanée de l'OTA atteignant 90 % ce qui les a poussé à confirmer que les levures *S. cerevisiae* et *S. bayanus* éliminent l'OTA par un processus d'adsorption. Une autre étude (Rousseau, 2003 ; ICV, 2003) a porté sur le marquage de l'OTA au tritium afin de suivre cette molécule pour comprendre sa diminution au cours de la fermentation alcoolique. Les proportions relatives de la radioactivité retrouvée ont permis de montrer que la totalité de la radioactivité était sous forme d'OTA inchangée. Il en résulte que la fermentation ne se traduit en aucune manière par une métabolisation de l'OTA. L'explication donnée parle de l'adsorption de l'OTA par la paroi des levures. Toutefois, si on considère que l'AFB1 a été de même adsorbée par les levures qui reste à démontrer.

Occurrence of Ochratoxin A and Aflatoxin B1-producing Fungi in Lebanese grapes and OTA content in musts and finished wines during year 2004

André EL KHOURY^{1,3}, Toufic RIZK¹, Roger LTEIF¹, Hayat AZOURI², Marie-Line DELIA⁴, Ahmed LEBRIHI^{3*}

¹Centre d'analyses et de recherches, Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph, Beyrouth, Liban.

²Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Pharmacie, Université Saint-Joseph, Beyrouth, Liban.

^{3,4}Laboratoire du Génie Chimique UMR5503 (CNRS-INPT-UPS), Département « Bioprocédés et Systèmes Microbiens »

³Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, Auzeville-Tolosane, Castanet-Tolosan, France.

⁴Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques Et Technologiques Toulouse Cedex 1, France.

Correspondance to: Lebrihi Ahmed. Laboratoire du Génie chimique, 1, avenue de l'agrobiopôle, BP32607, Auzeville-Tolosane, Castanet-Tolosan, France.

Tel: 00 33 (0) 5 62 19 39 44.

Fax: 00 33 (0) 5 62 19 39 01

E-mail address: lebrihi@ensat.fr

Abstract

This paper reports the results of an extensive survey on the occurrence of filamentous fungi isolated from wine-grapes in Lebanon and to test their ability to produce the Ochratoxin A (OTA) and the Aflatoxin B1 (AFB1) on CYA culture medium, in order to assess their potential for producing these mycotoxins on grapes. From the 470 grapes samples taken during season 2004, 550 fungi strains were isolated with 490 belonging to *Aspergillus* spp. and 60 belonging to *Penicillium* spp. All these isolated fungi strains were tested for their ability to produce the Ochratoxin A and the Aflatoxin B1. *Aspergillus carbonarius* shows that it is the only species able to produce the OTA with a production percentage reaching 100% and a maximum concentration of 52.8 µg/g CYA. In its turn, *Aspergillus flavus* was considered as the only AFB1-producing species with production percentage of 45.3% and a maximum concentration reaching 40 µg/g CYA. A total of 47 handmade musts produced from the collected grapes were also analyzed in order to correlate the presence of OTA in must and the occurrence of filamentous fungi on grapes. 57.4 % were contaminated with OTA at low level with concentrations ranging between 0.011 to 0.221 µg OTA L⁻¹. Whereas the analysis of these must samples was not performed with regard to AFB1. 70 samples of finish red wine were also assayed for OTA content. The results showed that 42 of the tested samples (60%) were found positive to OTA with low levels (0.012-0.126 µg OTA L⁻¹).

Keywords: Ochratoxin A, Aflatoxin B1, Black aspergilli, *Aspergillus flavus*, Grapes, Wine.

Introduction

Ochratoxin A is a mycotoxin of considerable concern with regard to human and animal health. This mycotoxin possesses nephrotoxic, teratogenic, and immunosuppressive properties (1). In fact, in 1993, the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified OTA as a possible human carcinogen (group 2 B) (2). Moreover, OTA is suspected to be involved in the Balkan endemic nephropathy (BEN) (a fatal kidney disease occurring in some areas of south-eastern Europe) and in the high frequency of urinary tract tumors observed in some Balkan areas (3).

Aflatoxin B1 is a secondary metabolite of the fungi *A.flavus* and *A.parasiticus* (4). It is considered as potent carcinogen, teratogen, highly toxic and mutagen to both humans and livestock. Chronic exposure to low levels of AFB1 poses serious health and economic hazards (5, 6).

The worldwide occurrence of OTA contamination of raw agricultural products has been well documented; such contamination occurs in a variety of food and feed, such as cereals, coffee beans, pulses (7, 8, 9, 10) wheat, barley, maize, and oats (11, 12), spices (13), meat and cheese products (14). OTA has also been detected in beverages such as beer, and since 1996 it has been detected in wine (15) (second most important source of OTA intake after cereals) (16) and grape juice (15). Several studies on wine and grape juice in France (17) Italy (18), Argentina and Brazil (19) but also on dried vine fruit in Spain (20, 21) showed that the occurrence of OTA was related to the grape contamination in the vineyard by several OTA-producing species of fungi especially the black aspergilli, mainly *A.carbonarius* and the members of the *A.niger* aggregates. *A.carbonarius* is considered as the major OTA producer species in wine grapes (16). Numerous studies show that moulds can be found on grapes from veraison onwards and sometimes even as soon as setting. Note that the moulds development increase rapidly between veraison and maturation (17).

Aflatoxin B1 can occur in a wide range of plant products including cereals such as maize, rice and wheat but also in nuts, spices, figs and dried fruits. This contamination occurs during growth, harvest or storage of foods and feeds especially when the conditions of temperature, relative humidity and product moisture are favorable.

Several authors (*15, 16, 22*) reflected that wines from southern regions of Europe and the North of Africa contain high concentrations of OTA due to the climate being characterized by high humidity and high temperature. However, until this study, there is no available information about the contamination of grapes by the Aflatoxin-producing fungi and/or the Aflatoxin.

In Lebanon, the situation was unknown due to the lack of data related to the mycoflora and the potential OTA and AFB1-producing fungi on wine grapes. Our study aims therefore to screen for the presence and characterization of the filamentous OTA and AFB1-producing fungi on wine grapes, to evaluate the contamination rate of those fungi associated with grape during the growing season and to test in vitro their capacity to produce these mycotoxins.

Materials and Methods

Study area

Lebanon is located between 35° - 36°40' longitude East and between 33° - 34°40' latitude North on the Eastern Mediterranean shores. It has a rectangular shape with 10.452 km² area. Seven winemaking regions were chosen for this study in the center and the South of the Bekaa plain since it is a good representative sample (>75% of wine-grapes vineyards) for the whole situation in Lebanon according to the study (Ksara, Tanayel, Itany, Mansoura, Tal Dnoub, Kefraya and Kanafar) (**Figure 1**).

Grape samples

Grape bunches were collected from 27 Lebanese vineyards at veraison (mid-July, end of August) and from 20 of those vineyards at harvesting (September, mid-October)

located in the chosen winemaking regions during the year 2004. The sampling protocol consists of taking from each vineyard a number of 10 bunches along two crossing diagonal transects. Bunches were kept in sterile bags and transported in cooled boxes (4°C) to the laboratory (2-3 hours) for analysis.

Culture media

The culture media used for fungi isolation and identification, were Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (**DRBC**) agar (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England), which contained per liter of distilled water: 10 g Glucose (Fisher Labosi Elancourt cedex, France); 5g meat peptone (Fisher Labosi Elancourt cedex, France); 1g KH_2PO_4 (Acros Geel, Belgium); 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Acros Geel, Belgium); 25 mg Rose Bengal; 2 mg Dichloran; 100 mg Chloramphenicol and 15 g agar (Difco, Fisher Labosi) (**23**). Czapek Yeast extract (**CYA**) (CZAPEK Yeast extract Agar, Oxoid) agar which contained per liter of distilled water: 30g sucrose (Fisher Labosi Elancourt cedex, France); 1ml trace metal (Cu + Zn) solution (Fisher Labosi); 1g K_2HPO_4 (Acros (Geel, Belgium); 10 ml Czapek concentrate; 5g yeast extract (Difco, Fisher Labosi) and 15 g agar (Difco, Fisher Labosi) (**23**).

Fungi isolation

Five berries were randomly taken from each bunch and directly plated onto (**DRBC**) medium in Petri dishes. All plates were incubated for 7 days at 25°C. After which all species belonging to the genera *Aspergillus* and *Penicillium* were isolated. For identification and morphological observations, isolated species were cultured on (**CYA**) medium and the identification was performed according to standard taxonomic systems based on the shape of conidiophores and conidia dimension observed with a binocular microscope with 100x magnification.

OTA and AFB1-producing ability of isolated fungi

Aspergillus and *Penicillium* isolates were grown in Petri dishes containing (CYA) medium for 7 days at 25°C. Three agar plugs were removed from different points of the colony for each culture, weighed and collected into small tubes. A volume of 0.9 ml of methanol was added to each tube, and the tubes were left stationary for 60 min. Extraction was done after 20 min of centrifugation at 13000 rpm for each tube and the extracts obtained were filtered through a 0.45 µm Millipore filter into small vials then analyzed and quantified by HPLC/FLD. The quantification of OTA and AFB1 was compared with that of standards of these two mycotoxins.

Extraction, detection and OTA quantification from musts and finished wines

The 10 bunches collected from each vineyard, were smashed and centrifuged 2 times at 4000 rpm for 10 minutes. A total of 47 must samples were obtained and frozen at -26°C for analysis.

With the aim of estimating the OTA content in finished wines, 70 samples of Lebanese wines were purchased from the supermarket and stored in fridge at 4°C until analysis.

The extraction and detection procedure of OTA in must and wine was strictly derived from the European norm (*EN 14133, V 03-128*). A volume of 10 ml of must or wine was diluted in 10 ml of water solution containing PEG (1%) (ACROS ORGANICS) and NaHCO₃ (5%). The pH value of the result solution corresponds to the range 7.2-7.8. The solution was filtered through Whatman® GF/A glass micro fiber filter with porosity of 1.6 µm. The filtrate was then passed through the Ochrapep Immuno Affinity Column (IAC) (r-Biopharm, St Didier Au Mont D'Or, France) at a flow rate of 1 drop/second. The column was successively washed with 5 ml of water solution containing NaCl (2.5%) and NaHCO₃ (0.5%) followed by 5 ml of HPLC grade water at a flow rate of 1-2 drops/second and dried with air. OTA was eluted by 2 ml of HPLC grade methanol through the IAC at a flow rate of 1 drop/second. The eluate, collected in an HPLC vial

(WHEATON, USA; 2 ml), was evaporated under nitrogen stream at 50°C and reconstituted with 250 µl of mobile phase prior to HPLC analysis.

The chromatographic system

For OTA detection

OTA was detected and quantified by reversed-phase HPLC. The analysis was performed using a chromatographic system equipped with an auto sampler (Agilent 1100, G1313A, ALS) and a fluorescence detector (Agilent 1100, G 1321A, FLD) set at 333nm (excitation) and 460 nm (emission). The system was controlled by Chemstation software. A selected RP-18 Column (5µm particle size, 250mm length x 4mm internal diameter) (Lichrospher® 100) was chosen at room temperature. The mobile phase (Acetonitrile: Water: Acetic acid/ 99:99:2) (Scharlau) was pumped (Agilent 1100, Quat pump, G1311A) at a flow rate of 1.0 ml/min. The injection volume corresponds to 100µl and the retention time was about 8 minutes. In these conditions, limit of detection of OTA was of 0.01 ng.ml⁻¹

For AFB1 detection

The HPLC method for Aflatoxin B1 analysis was adapted from Chan et al (24). The apparatus consisted of a solvent delivery system with both fluorescence ($\lambda_{ex}=364$ nm; $\lambda_{em}=440$ nm) and UV detectors ($\lambda=225$ nm and 362 nm). The spectra range is from 200 to 500 nm. The analytical column used was a 150x4.6 mm Uptisphere 5 µm C18 ODB fitted with a guard column of 10x4 mm. During analysis, the column temperature was maintained at 25°C. An aliquot of sample (80 µl) was injected using an auto-injector (BIO-TEK, Milan, Italy). The mobile phase was 0.1% phosphoric acid (A) and methanol/acetonitrile (50:50) (B) delivered at flow rate of 1 ml/min. the retention time was about 6 minutes.

Results

Total fungi isolates from grapes

During 2004 a total of 470 grape samples (270 from veraison and 200 from harvesting) were collected from 7 wine-grape growing regions. Genera of *Aspergillus* and *Penicillium* were systematically isolated, counted and identified. The total fungal isolates were 550, with 490 (89.1%) belonging to *Aspergillus spp.* and 60 (10.9%) belonging to *Penicillium spp.* (**Figure 2 a**).

Based on the morphology of the conidial head and the shape of the conidia, identification to species levels was carried out for all *Aspergillus* strains.

From the 490 *Aspergillus* strains identified, the most frequent were from section *Nigri* (87.3%) namely the bisseriate species *A.niger aggregates* (81.4%), *A.carbonarius* (1.8%) and the uniseriate species *A.japonicus* (4.1%). However, other isolates belonging to the *Aspergillus* genus other than the section *Nigri* are well known as potential producers of mycotoxins namely *A.flavus*, the most known isolated species to be described as an aflatoxin producer (25) with an isolation rate of 12.7% (**Figure 2 b**).

Black *aspergilli* were present in all vineyards at the two sampling periods. Their isolation rate found in the sampled grapes was 56.25%. Moreover, the percentage of the infected grapes-berries shows in general an increasing tendency during the development of the berry and achieving the highest levels at harvest time (**Figure 3**).

Mycotoxigenic capacity of fungal isolates

From all fungal isolates, *A.carbonarius* was the single OTA producer with production percentage of 100% and maximum concentrations of 52.8µg/g CYA. None of the others species of the *nigri* section neither *A.flavus* has produced the Ochratoxin A at a detectable limit. Concerning *Penicillium* genus, none of the isolates was identified as an OTA producer. With regard to the Aflatoxin B1, *A.flavus* was considered as the single AFB1-

producing species with production percentage of 45.3 % and a maximum concentration reaching 40 µg/g CYA.

OTA detection in handmade must

The results of the analysis made on 47 samples of handmade must are summarized in **Table 1**. Those results show that 27 samples (57.4%) were contaminated with OTA at low level (<0.25 µg/L). The most contaminated ones were 7 samples that reached a maximum concentration of 0.221 µg OTA L⁻¹. Twenty other samples showed traces of OTA with concentrations ranging from 0.011 to 0.075 µg OTA L⁻¹, whereas no OTA was detected in 20 of those hand made samples. None of the contaminated samples contains levels above the European MRLs fixed at 2 µg OTA L⁻¹.

Analysis of OTA content in wine

Of the 70 finished red wines samples originating from the Bekaa valley and purchased from the supermarket, 42 samples (60%) were found positive to OTA with low levels of contamination (range 0.012-0.126 µg OTA L⁻¹), while the mycotoxin was not detected in 28 of those samples (40%) (**Table 2**). None of the contaminated samples contains levels above the European MRLs fixed at 2 µg OTA L⁻¹.

Discussion

Black aspergilli have been reported as the predominant mycobiota of grapes. In our study, results show that *Aspergillus* and *Penicillium* strains were present in all vineyards at all maturation stages. Black aspergilli (namely *A.niger aggregates*, *A.carbonarius* and *A.japonicus*) were the most common and they constituted 87.3 % of the total *Aspergillus* strains isolated from grapes at veraison and harvesting. These results are similar to those found in Mediterranean vineyards in France (17) Italy (18) and Spain (30).

The similar results obtained in general with regard to the *Aspergillus spp.* distribution can be explained by the fact that those vineyards belong to the same wine producer and thus they are subjected to the same cultural practices. Moreover, they are in the same

geographic area with the same climatic conditions characterized by a very low humidity (30%) and a high temperature (34-38°C) during the maturation period even though they are distributed within 7 grape-grown regions. The little difference in fungi occurrence stresses is that even though they belong to the same climatic area, each vineyard possesses a microclimate, which can affect the grape infection through the maturation stages, leading to a variation in the dynamics of the fungi occurrence.

As for the OTA production ability of fungi, our results obtained from Lebanese vineyards support highly that *A.carbonarius* is without doubt the major producer of OTA within *Aspergillus* section *Nigri*. this fact is due to the extremely high percentage of its ochratoxigenic isolates, since the 490 *Aspergillus* isolates, *A.carbonarius* showed that it is the only ochratoxigenic species with a production ability reaching 100% while none of the other species isolates shows an ability to produce this mycotoxin at a detectable limit. The results obtained from other surveys conducted in Spain (31, 32), Portugal (33) Italy (18) and France (17) on OTA-producing fungi, show also that *A.carbonarius* is considered as the main OTA-producer and that its ochratoxigenic potential was not only occasioned by its intrinsic toxigenic character but also by its aggressiveness (34). In these countries, and to a lesser extent, *A.niger* was detected as a producer of OTA. However, its level of production remains very low compared to that of *A.carbonarius*.

However, the occurrence of an Aflatoxin-producing fungus on grapes is of great importance since the *A.flavus* is considered as a none habitual member of the natural grape mycobiota given its low incidence on this fruit (35, 36). The studies conducted in the other Mediterranean countries revealed a very low occurrence of this species in the vineyards (35, 36). Our results showed that the isolation rate of the *A.flavus* was 12.7% and where 45.3% of its isolates were able to produce the AFB1 at a maximum concentration reaching 40µg/g CYA. Magnoli *et al*, (2003) (37) have reported the occurrence of *A.flavus* in Argentinean grapes. In their study, the isolation rate of this species was about 17% but no information has been given regarding the *A.flavus*

production capacity of AFB1. Unfortunately, within the framework of our study, the occurrence of AFB1 in must and finished wines was not carried out.

As for must, several authors reflected that the occurrence of OTA in grapes juices and wines is linked to the presence of the ochratoxigenic fungi on grapes. Our must analysis shows that 27 samples (57.4%) were contaminated with low concentrations of OTA reaching a maximum of 0.221 $\mu\text{g OTA L}^{-1}$ (**Table 1**). So, independently of the growth stage considered, OTA was not always detected in grapes, even in those colonized by section Nigri. In other cases, some must samples were contaminated with OTA despite that the originated vineyards were not contaminated with *A. carbonarius* (**Table 3**). So the OTA production seems probably to be linked to other species even that those species did not produce the OTA at a detectable limit when isolated in the laboratory.

Many authors mentioned that wines, and especially red wines, originating from regions with Mediterranean climates (southern Europe and north Africa) are more contaminated than those originating from temperate regions of central Europe (**15, 26**), with maximum concentrations reaching 7.6 $\mu\text{g OTA L}^{-1}$ (**27**), 4 $\mu\text{g OTA L}^{-1}$ (**28**), 0.736 $\mu\text{g OTA L}^{-1}$ (**29**), 0.451 $\mu\text{g OTA L}^{-1}$ (**15**). Our results (**Table 1**) showed that 60% of the tested samples were contaminated with low levels of OTA with a maximum concentration reaching 0.126 $\mu\text{g OTA L}^{-1}$. While Lebanon is considered as a Mediterranean country, the low levels of OTA content in wine could be explained by the fact that all the tested samples were originated from the Bekaa valley which is separated from the Mediterranean sea by high mountainous chains culminating to 3000 m and where all the Lebanese wine-grapes vineyards are located. This fact makes the studied area characterized by a semi-arid climate with high temperature and a low humidity which could not be favorable to the growth of OTA-producing fungi and/or OTA production.

For the present time, the low OTA levels detected can be probably explained by the fact that the low humidity (30%) is not favorable to OTA synthesis in the studied area or, to produce the mycotoxin, fungi require high humidity levels (above 70%). we can also

consider that the majority of our *Nigri* section isolates belongs to the *A.niger* aggregates (81.4%) which are considered as low/or non OTA producers. So the occurrence of black Aspergilli does not necessarily indicate an OTA production. Thus, it appears that the nature of the fungi species coupled with extrinsic factors like the climatic conditions play a major role in mycotoxin production. Gaining an understanding, the influence of the physicochemical conditions on the growth and production of OTA by isolates originating from Lebanon require further studies. This work and data collection will be pursued within our laboratory for the next years to come up with a conclusive explanation of this fact.

In conclusion, the results of this survey point out that black Aspergilli are the predominant mycobiota of grapes where *A.carbonarius* is considered as the main OTA producer which can play a major role in the OTA contamination of grapes and its derived. The musts and finished wines analysis shows a low OTA contamination. However, none of the contaminated samples contains levels above the European MRLs fixed at 2 µg OTA L⁻¹.

More studies on fungi occurrence in grapes are needed in order to evaluate the different susceptibility to mycotoxin formation by different species of these fungi; Especially that we saw here the occurrence of *A.flavus* with a higher percentage than that of *A.carbonarius* in addition to the production of the Aflatoxin B1 by 45.3% of its isolates which guide us to follow the existence of AFB1 in must and wine. So, field sampling will be continued as well as the characterization of strains and data collection about the farming methods and the climate variation in order to determinate the interactions between mycotoxigenic fungal species present on grapes and to ensure mycotoxins free grape products.

Abbreviations Used

OTA: Ochratoxin A.

AFB1: Aflatoxin B 1.

BEN: Balkan Endemic Nephropathy.

A.: Aspergillus

HPLC-FLD: High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detector.

CYA: Czapek Yeast Extract Agar.

DRBC: Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar.

IARC: International Agency for Research on Cancer.

Ex: Excitation.

Em: Emission.

MRLs : Maximum Residue Limits.

Literature Cited

1. Pitt, D.B; Plestina, J.I; Shepard, R; Solfrizzo, G; Verger, M; Walker, P.J.P. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. In *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)*, Food and Agriculture Organization, Rome, **2001**, pp 281.
2. IARC. Ochratoxin A. In *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*; International Agency for Research on Cancer: Geneva, Switzerland, **1993**; Vol 56. pp 26-32.
3. Pfohl-Leszkowicz, A.; Petkova-Bocharova, T.; Chernozemsky, I.N.; Castegnaro, M. *Food Addit. Contam.* **2000**, *19*, 282.
4. Bennett, J.W.; Klich, M. Mycotoxins. *Clinic. Microbiol. Rev.* **2003**, *16.3*, 497-516.
5. Karlowsky, P. Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Nat Toxins.* **1999**, *7*, 1-23.
6. Mishra, H.N.; Das, C. A Review on Biological Control and Metabolism of Aflatoxin. *Food Sci Nutri. Rev.* **2003**, *43*, *3*, 245-264.
7. Jørgensen, K. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* **1998**, *15*, 550-554.
8. Kuiper-Goodman, T.; Scott, P.M. Risk assessment of the mycotoxin Ochratoxin A. *Biomed. Envir. Sci.* **1989**, *2*, 179-248. (ABSTRACT).

9. Micco, C.; Grossi, M.; Miraglia, M.; Brera, C. A study of the contamination by Ochratoxin A of green and roasted beans. *Food Addit. Contam.* **1989**, *6*, 333-339. (ABSTRACT).
10. Pohland, A.E.; Nesheim, S.; Friedman, L. Ochratoxin A: a review. *Pure Appl. Chem.* **1992**, *64*, 1029-1046. (ABSTRACT)
11. Speijers, G.J.A.; Van Egmond, H.P. World-wide ochratoxin A levels in food and feeds. In *Human Ochratoxicosis and its Pathologies*,; Creppy, E., Castegnaro, M., Dirheimer, G.; John Libbey Eurotext Ltd., Paris, **1993**.; 85-100.
12. Trucksess, M.W.; Giler, J.; Young, K.; White, K.D.; Page, S.W. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee-1997. *JAOAC Int.* **1999**, *82*, 85-89.
13. Hubner, M.; Vrabcheva, T.; Gareis, M. Simultaneous detection of ochratoxin A and B in spices and herbs by immunoaffinity column cleanup and HPLC. *Recueil Medecine Veterinaire* **1998**.; pp 507.
14. Gareis, M.; Scheuer, R. (2000). Ochratoxin A in meat and meat products. *Arch.Lebensmittelhyg.* **2000**, *51*, 102-103.
15. Zimmerli, B.; Dick, R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment. *Food Addit. Contam.* **1996**, *13*, 655-668.
16. Cabañes, F.J.; Accensi, F.; Bragulat, M.R.; Abarca, M.L.; Castella, G.; Minguéz, S.; Pons, A. What is the source of Ochratoxin A in wine? *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, *79*, 213-215.
17. Bejaoui, H.; Mathieu, F.; Taillandier, P.; Lebrihi, A. Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. **2006**. In press.

18. Battilani, P.; Pietri, A.; Bertuzzi, T.; Languasco, L.; Giorni, P.; Kozakiewicz, Z. Occurrence of Ochratoxin A-producing fungi in grape grown in Italy. *J. Food Protec.* **2003**, *66*, 633-636.
19. Da Rocha Rosa, C.A.; Palscios, V.; Combia, M.; Fraga, M.E.; De Oliveira Rekson, A.; Magnoli, C.E.; Dalcerro, A.M. Potential Ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Addit. Contam.* **2002**, *19*, 408-414.
20. Abarca, M.L.; Accensi, F.; Bragulat, M.R.; Castella, G.; Cabañes, F.J. *A.carbonarius* as the main source of Ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *J. Food Protec.* **2003**, *66*, 504-506.
21. Heenan, C.N.; Shaw, K.J.; Pitt, J.I. Ochratoxin A production by *A.carbonarius* and *A.niger* isolates and detection using coconut cream agar. *J. Food Mycol.* **1998**, *1*, 67-72.
22. Blesa, J.; Soriano, J.M.; Molto, J.C.; Manes, J. Concentration of ochratoxin A in wines from supermarkets and stores of valencian Community (Spain). *J. Chromatogr.* **2004**, *1*, 2, 397- 401.
23. Pitt, J.I.; Hocking A.D. (Eds) Fungi and food spoilage. Blackie, London. **1997**.
24. Chan, D.; MacDonald, S.J.; Boughtflower, V.; Brereton, P. Simultaneous determination of aflatoxins and Ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean up liquid chromatography-fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.* **2004**, *1*, 2, 13-16.
25. Bau, M.; Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Minguez, S., Cabañes, F.J. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *98*, 125-130.

26. Otteneder, H.; Majerus, P. Occurrence of ochratoxin A in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Addit. Contam.* **2000**, *17*, 793-798.
27. Visconti, A.; Pascale, M.; Centonze, G. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **1999**, *864*, 89-101.
28. MAFF. Survey of aflatoxin and ochratoxin in cereals in retail products. *Food Surveillance Sheet.* **1997**, *130*, 1-8.
29. Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L., Piva, G. 2001. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Addit. Contam.* **2001**, *18*, 7, 647-654.
30. Belli, N.; Marin, S.; Duaignes, A.; Ramos, A. J.; Sanchis, V. Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. *J. Sci. Food and Agri.* **2004a**, *84*, 591-594.
31. Abarca, M.L.; Accensi, F.; Bragulat, M.R.; Cabañes, F.J. Ochratoxin A-producing black aspergilli in dried vine fruits. In *Book of abstracts "Bioactive fungal metabolites – Impact and Exploitation"* Swansea, Wales. **2001**. pp 38.
32. Cabañes, F.J., Accensi, F. Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Minguéz, S., Pons, A. *A.carbonarius* is a source of ochratoxin A contamination in wine. In *Book of abstracts "Bioactive Fungal Metabolites – Impact and exploitation"* Swansea, Wales. **2001**. pp 51.
33. Serra, R.; Abrunhosa, L.; Kozakiewicz, Z.; Venancio, A. Black *Aspergillus* species as Ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *88*, 63-68.
34. Battilani, P.; Pietri, A. Ochratoxin A in grapes and wine. *Eur.J.Plant pathol.* **2002**, *108*, 639-643.

35. Martinez-Culebras, P.V.; Ramon, D. An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. *Int. J. Food Microbiol.* **2006** (*in press*).
36. Medina, A.; Mateo, R.; Lopez-Ocana, L.; Valle-Algarra, F.M.; Jimenez, M. Study of Spanish Grape Mycobiota and Ochratoxin A Production by Isolates of *Aspergillus tubingensis* and Other Members of *Aspergillus* section Nigri. *Appl Environ Microbiol.* **2005**, *71*, 4696-4702.
37. Magnoli, C.; Violante, M.; Combina, M.; Palacio, G.; Dalcero, A. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section Nigri in wine grapes in Argentina. *Lett Appl Microbiol.* **2003**, *37*, 179-184.

Figure Captions

Figure 1. Origin of samples from Bekaa valley

Figure 2. a- Occurrence of Aspergillus spp. and Penicillium spp. from all maturation stages, b-The isolation rates of species belonging to Aspergillus spp.

Figure 3. Percentage of infected grape-berries by Black aspergilli in each vineyard at two stages of grapes maturation, veraison and harvesting. ^a Vineyards not sampled during harvesting.

Concentration range $\mu\text{g OTA L}^{-1}$	Maximum concentration $\mu\text{g OTA L}^{-1}$	Number of samples at maturation stage		Total of samples
		Veraison	Harvesting	
0.1-0.5	0.221	3	4	7
<0.05-0.1	0.075	3	2	5
0.01-0.05	0.043	8	7	15
<DL ^a	-	13	7	20

Table 1. Contamination rate of 47 hand made musts by OTA

^aDL= detection limit

Table 2. Contamination rate of 70 samples of Lebanese finished wines by OTA

Concentration range $\mu\text{g OTA L}^{-1}$	Maximum concentration $\mu\text{g OTA L}^{-1}$	Total of samples
0.1-0.5	0.126	2
<0.05-0.1	0.088	7
0.01-0.05	0.048	33
<DL ^a	-	28

^aDL= detection limit

Table 3. Occurrence of A.carbonarius on grapes and OTA content in grape-derived musts

Vineyard	Presence of <i>A.carbonarius</i>			Presence of OTA in must	
	Veraison	Harvesting	Total of strains	Veraison	Harvesting
1	-	+	1	-	-
2	-	+	1	+	+
3	-	-	---	-	+
4	-	-	---	+	+
5	-	-	---	-	-
6	-	-	---	+	-
7	-	***	---	+	***
8	-	-	---	-	-
9	-	+	1	+	-
10	-	***	---	-	***
11	-	***	---	-	***
12	-	+	1	+	+
13	-	-	---	-	-
14	-	-	---	-	-
15	+	+	1	-	+
16	-	***	---	-	***
17	-	-	---	+	+
18	+	-	---	-	+
19	+	-	---	+	+
20	-	***	---	+	***
21	-	+	1	+	-
22	-	-	---	+	+
23	-	-	---	-	+
24	-	***	---	+	***
25	-	***	---	+	***
26	-	-	---	+	+
27	-	-	---	+	+

***Sample was not taken ; +presence; -Absence

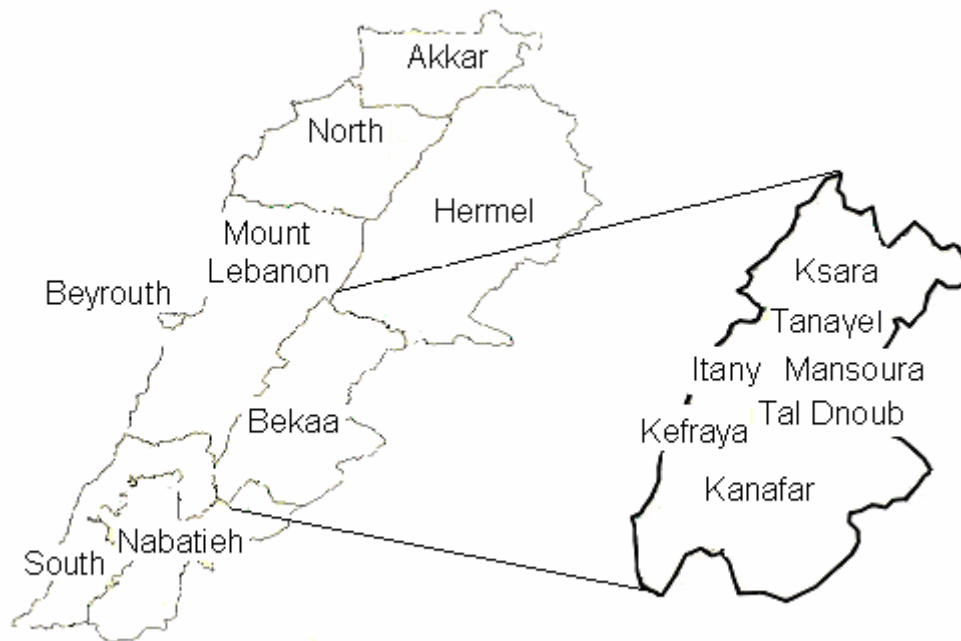


Figure 1

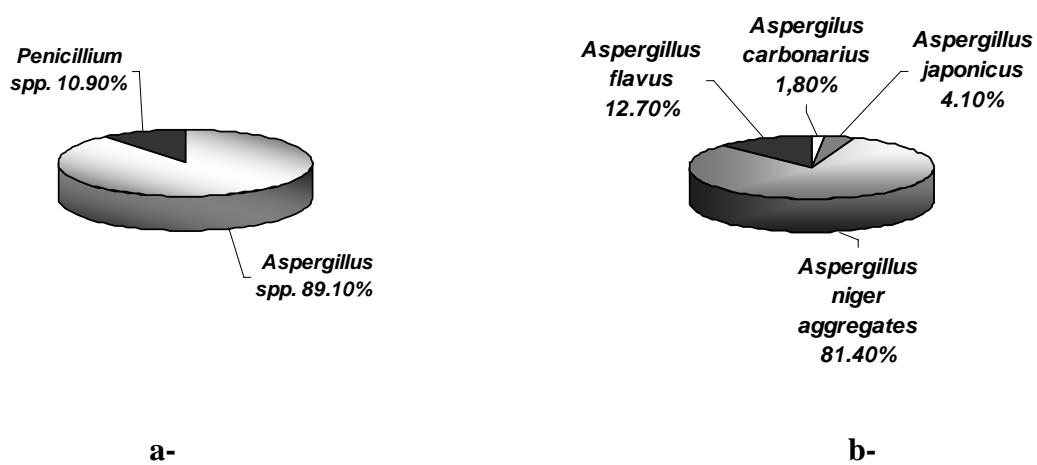


Figure 2

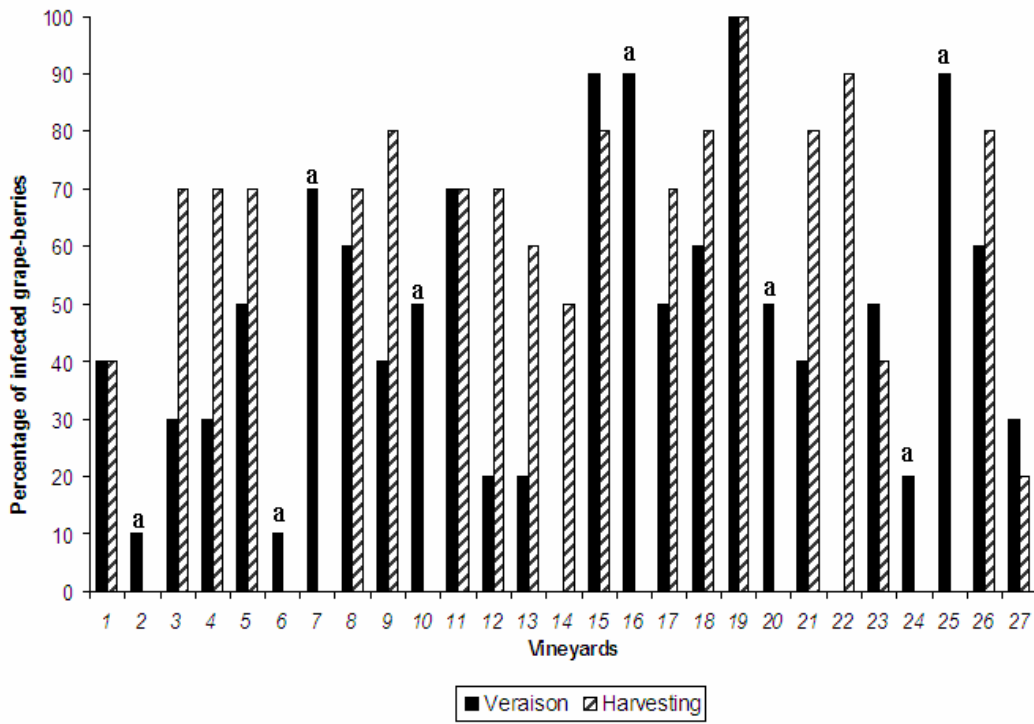


Figure 3

Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine-grapes and musts.

André EL KHOURY^{1, 3}, Toufic RIZK¹, Roger LTEIF¹, Hayat AZOURI², Marie-Line DELIA⁴, Ahmed LEBRIHI^{3*}

Aflatoxin B1 in Lebanese wine grapes

¹Centre d'analyses et de recherches, Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph, Beyrouth, Liban.

²Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Pharmacie, Université Saint-Joseph, Beyrouth, Liban.

Laboratoire du Génie Chimique UMR5503 (CNRS-INPT-UPS), Département « Bioprocédés et Systèmes Microbiens » ³Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, Auzeville-Tolosane, Castanet-Tolosan, France and ⁴Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques Et Technologiques Toulouse Cedex 1, France

Correspondance to: Lebrihi Ahmed. Laboratoire du Génie chimique, 1, avenue de l'agrobiopôle, BP32607, Auzeville-Tolosane, Castanet-Tolosan, France.

Fax: 00 33 (0) 5 62 19 39 01

E-mail address: lebrihi@ensat.fr

Abbreviations Used

OTA, Ochratoxin A; AFB1, Aflatoxin B 1; AF, Aflatoxin; BEN, Balkan Endemic Nephropathy; *A.*, *Aspergillus*; HPLC-FLD, High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detector; CYA, Czapek Yeast Extract Agar; DRBC, Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar; IARC, International Agency for Research on Cancer; Ex, excitation; Em, emission; MRLs, Maximum residue limits.

Keywords: Aflatoxin B1, Ochratoxin A, Black aspergilli, *Aspergillus flavus*, Grapes, must.

Abstract

Five hundred and ten strains of filamentous fungi were isolated from Lebanese grapes during 2005 at veraison and harvesting periods. 487 isolates belonged to the *Aspergillus* spp. (95.5%) and 23 belonged to the *Penicillium* spp. (4.5%). Black aspergilli constituted 56.9% (52.2% *Aspergillus niger* aggregates, 2.9% *Aspergillus japonicus* and 1.8% *Aspergillus carbonarius*) while the isolation rate of *Aspergillus flavus* the none habitual member of grape mycobiota was 43.1% of the total *Aspergillus* spp. isolated. All isolates were tested for the ability to produce the Ochratoxin A (OTA) and the Aflatoxin B1 (AFB1). *A. carbonarius* showed that it is the only species able to produce the OTA with a production ability of 100% and a maximum concentration reaching 8.38µg/g CYA. As for the aflatoxigenic ability, 43.4% of *A. flavus* isolates produced this mycotoxin with a maximum production reaching 22.6 µg/g CYA while none of the other isolates showed a production capacity of this mycotoxin. 47 samples of must produced from the collected grapes were also analyzed. None of these samples was contaminated by OTA at a detectable limit while 40% of these same samples were found to contain AFB1 with concentrations ranging from 0.01 to 0.46 µg.L⁻¹.

1 Introduction

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin with nephrotoxic, teratogenic, and immunosuppressive properties (Pitt *et al.*, 2001). It has been classified in 1993 by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as a possible human carcinogen (group 2 B) (IARC, 1993). OTA is suspected to be involved in the Balkan Endemic Nephropathy (BEN) (a fatal kidney disease occurring in some areas of south-eastern Europe) and in the high frequency of urinary tract tumors observed in some Balkan areas (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2000).

Surveys conducted in many different countries revealed the presence of OTA in different foodstuffs (Burdaspal and Legarda, 1999; Pietri *et al.*, 2001; Sage *et al.*, 2002) such as cereals, coffee beans, pulses (Jorgensen, 1998; Kuiper-Goodman and Scott, 1989; Micco *et al.*, 1989; Pohland *et al.*, 1992) wheat, barley, maize, and oats (Speijers and Van Egmond, 1993; Trucksess *et al.*, 1999), spices (Hubner *et al.*, 1998), meat and cheese products (Gareis *et al.*, 2000).

Aflatoxins (AFs) are a group of a highly toxic secondary metabolites produced by the filamentous fungi *A. flavus* and *A. parasiticus* (Deiner *et al.*, 1987; Kutrzman *et al.*, 1987) and to a lesser extent *A. nomius*, *A. tamarii* (Goto *et al.*, 1997) and *A. pseudotamarii* (Ito *et al.*, 2001). Under favorable conditions of temperature and humidity, these fungi grow on certain foods and feeds, resulting in the production of these metabolites.

Aflatoxins are considered as natural contaminants of a variety of agricultural products. The most pronounced contamination has been encountered in corn, peanuts, cottonseed, and other grain crops being most frequently contaminated (Gourama and Bullerman, 1995; Jelinek *et al.*, 1989). Diet is the major way through which humans as well as animals are exposed to these mycotoxins. Apart from this, exposure to aflatoxins can be through ingestion of contaminated food and feed.

The major AFs of concern are designated as B1, B2, G1 and G2. However, Aflatoxin B1 (AFB1) is the most predominant and the most toxic aflatoxin with a toxicity demonstrated in all species of animals tested, resulting in LD₅₀ values ranging from 0.3 to 9.0 mg/kg body weight. AFB1 is also known as being one of the most potent genotoxic agent and hepatocarcinogen identified (IARC, 1993; Busby and Wogan, 1984; Sharma and Salunkhe, 1991; Miller and Trenholm, 1994; Wang *et al.*, 1998).

The European Commission set the maximum level for AFB1 in foods to 2 ng/g, although new limits are likely to be established at 1 ng/g (Stroka and Anklam, 2002).

Grapes can be contaminated with a wide variety of molds including *Aspergillus* and *Penicillium* genera. Among *Aspergillus* genus, black aspergilli seemed to be the most common contaminant of grapes namely *A. niger* aggregates and *A. carbonarius* the most known Ochratoxin A-producing species. Reports by several authors showed that grape and its derived products such as dried vine fruits (MacDonald *et al.*, 1999), grape juices and wines (Burdaspal and Legarda, 1999; Jorgensen, 1998; Zimmerli and Dick, 1996; Visconti *et al.*, 1999; Otteneder and Majerus, 2000) were highly contaminated by the ochratoxin A.

However, until now, there is no available information on the occurrence of the AFB1 on grapes and its derived products since the studies conducted in other Mediterranean countries revealed a very low occurrence the *A. flavus* in the vineyards (Martinez-Culebras and Ramon, 2006; Medina *et al.*, 2005; Melki Ben Fredj *et al.*, 2006). However, in these studies, no quantification of the AFB1 in grapes or its products was performed.

This current document provides, in a timely manner, data on the occurrence of the AFB1 and the OTA-producing species on Lebanese grapes and on the levels of these two mycotoxins in the derived musts.

2 Materials and methods

2.1 Study area

Lebanon is located between 35° - 36°40' longitude east and between 33° - 34°40' latitude north on the eastern Mediterranean shores. It has a rectangular shape with 10.452 km² area. Seven winemaking regions were chosen for this study in the center and the south of the Bekaa plain since it is a good representative sample for the whole situation in Lebanon according to the study (Ksara, Tanayel, Tal Dnoub, Itany, Mansoura, Kefraya and Kanafar) (**Figure 1**).

2.2 Grape samples

27 vineyards belonging to the study area were chosen. From each vineyard, Grapes were collected from July to October at 2 developmental stages of the berries: early veraison (mid-July, end of August) and ripe berry (September, mid-October) during the year 2005. The sampling protocol consists of taking from each vineyard a number of 10 bunches along two crossing diagonal transects. Bunches were kept in sterile bags and transported within 2-3 hours in cooled boxes (4°C) to the laboratory for analysis.

2.3 Culture media

The culture media used for fungi isolation and identification, were Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) agar (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England), which contained per liter of distilled water: 10 g Glucose (Fisher Labosi Elancourt cedex, France); 5g meat peptone (Fisher Labosi Elancourt cedex, France); 1g KH₂PO₄ (Acros Geel, Belgium); 0.5 g MgSO₄-7H₂O (Acros Geel, Belgium); 25 mg Rose Bengal; 2 mg Dichloran; 100 mg Chloramphenicol and 15 g agar (Difco, Fisher Labosi) (Pitt and Hocking, 1997). Czapek Yeast extract (CYA) (CZAPEK Yeast extract Agar, Oxoid) agar which contained per liter of distilled water: 30g sucrose (Fisher Labosi Elancourt cedex, France); 1ml trace metal (Cu + Zn) solution (Fisher Labosi); 1g K₂HPO₄ (Acros

Geel, Belgium); 10 ml Czapek concentrate; 5g yeast extract (Difco, Fisher Labosi) and 15 g agar (Difco, Fisher Labosi) (Pitt and Hocking, 1997).

2.4 Fungi isolation

Five berries were randomly taken from each bunch and directly plated onto (DRBC) medium in Petri dishes. All plates were incubated for 7 days at 25°C. After which all species belonging to the genera *Aspergillus* and *Penicillium* were isolated. For identification and morphological observations, isolated species were cultured on (CYA) medium pH 6.7 and the identification was performed according to standard taxonomic systems based on the shape of conidiophores and conidia's dimension as observed with a binocular microscope with 100x magnification.

2.5 AFB1 and OTA-producing ability

Aspergillus and *Penicillia* isolates were grown in Petri dishes containing (CYA) medium pH 6.7 for 7 days at 25°C. Three agar plugs of the solid medium were removed from different point of the colony for each culture, weighted and collected into small tubes. A volume of 0.9 ml of methanol was added to each tube, and the tubes were left stationary for 1 hour. Extraction was done after 20 min of centrifugation at 13000 rpm for each tube and the obtained extracts were filtered through a 0.45 µm Millipore filter into small vials then analyzed and quantified by HPLC/FLD. The quantification of OTA and AFB1 was compared with that of standards of these two mycotoxins.

2.6 Extraction, detection of AFB1 and OTA from must

The 10 bunches collected from each vineyard, were crushed and centrifuged 2 times at 4000 rpm for 10 min. A total of 47 must samples were obtained and frozen at -26°C until analysis.

2.6.1 For AFB1

The extraction of the AFB1 from must was adapted from El Adlouni *et al.*, (2006) but modified. 10 ml of must were taken on which 40 ml of (n-hexane) were added and

shaken for 1 min. After separation, the upper phase (n-hexane) was discarded. This step was repeated. To the combined lower phase, 20 ml deionised water and 40 ml of chloroform were added. The solution was shaken for 10 min. After separation, the lower phase (chloroform) was collected. The upper phase was re-extracted 2 times with 20 ml of chloroform using the above conditions. The chloroform extracts were pooled, extracted with 20 ml sodium bicarbonate and the mixture shaken for 10 min. after separation, the aqueous phase was acidified to pH 1.5 with hydrochloric acid. The acidified aqueous phase was extracted 2 times with chloroform (40 ml, 20 ml).

The pooled chloroform was evaporated to near dryness under vacuum using a rotatory evaporator in a 40°C water bath at low speed. 2 ml of methanol were added and the solution was sonicated and filtered through cartridges and finally evaporated to dryness under nitrogen stream. For HPLC analysis 500 µl of methanol were added.

2.6.2 For OTA

The extraction and detection procedure was strictly derived from the European norm (EN 14133, V 03-128). A volume of 10 ml of must was diluted in 10 ml of water solution containing PEG (1%) (ACROS ORGANICS) and NaHCO₃ (5%). The pH value of the resulting solution was about 7.2. The solution was filtered through Whatman® GF/A glass micro fiber filter with porosity of 1.6 µm. The filtrate was then passed through the Ochrapap ImmunoAffinity Column (IAC) (r-Biopharm) at a flow rate of 1 drop/second. The column was successively washed with 5 ml of water solution containing NaCl (2.5%) and NaHCO₃ (0.5%) followed by 5 ml of HPLC grade water at a flow rate of 1-2 drops/second and dried with air. OTA was eluted by 2 ml of HPLC grade methanol through the IAC at a flow rate of 1 drop/second. The eluate, collected in an HPLC vial (WHEATON, USA; 2 ml), was evaporated under nitrogen stream at 50°C and reconstituted with 250 µl of mobile phase prior to HPLC analysis.

2.7 The chromatographic system

2.7.1 For AFB1 quantification

The HPLC method for Aflatoxin B1 analysis was adapted from *Chan et al* (2004). The HPLC apparatus consisted of a solvent delivery system with both fluorescence ($\lambda_{\text{ex}}=364$ nm; $\lambda_{\text{em}}=440$ nm) and diode array UV detectors ($\lambda=225, 267$ and 362 nm). The spectra range is from 200 to 500 nm. The analytical column used was a 150x4.6 mm Uptisphere 5 μm C18 ODB fitted with a guard column of 10x4 mm. The column temperature was 25°C. An aliquot of sample (80 μl) was injected using an auto-injector (BIO-TEK, Milan, Italy). The mobile phase was 0.1% phosphoric acid (A) and methanol/acetonitrile (50:50) (B) ((A : B / 56 : 44)) delivered at flow rate of 1 ml/min. the retention time was about 6 minutes (**Figure 2**). In these conditions, limit of detection of AFB1 in must by the system used was about 0.01 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

2.7.2 For OTA quantification

OTA was detected and quantified by reversed-phase HPLC. The analysis was performed using a chromatographic system equipped with an auto sampler (Agilent 1100, G1313A, ALS) and a fluorescence detector (Agilent 1100, G 1321A, FLD) set at 333nm (excitation) and 460 nm (emission). The system was controlled by Chemstation software. A selected RP-18 Column (5 μm particle size, 250mm length x 4mm internal diameter) (Lichrospher® 100) was chosen at room temperature. The mobile phase (Acetonitrile: Water: Acetic acid/ 99:99:2) (Scharlau) was pumped (Agilent 1100, Quat pump, G1311A) at a flow rate of 1.0 ml/min. The injection volume corresponds to 100 μl and the retention time was about 8 minutes. Detection limit of OTA was also about 0.01 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

2.8 Recoveries

2.8.1 For OTA and AFB1

For each mycotoxin, accuracy was estimated by determining the recovery factors by an artificial contamination of 8 must samples with known concentrations of AFB1: 0.01 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 0.025 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 0.05 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 0.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 0.25 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 0.5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 0.75 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$. The recoveries of the extraction technique were evaluated by the comparison of the mycotoxin (OTA and AFB1) concentration detected by HPLC in each sample with the known concentration added to it. The recoveries were estimated about 90%. The detection limit (LOD) was about 0.01 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

2.9. AFB1 confirmation

While no study was done before on the extraction and the analysis of AFB1 in must, confirmation of the method was necessary. To achieve this goal, underivatized AFB1 were separated by HPLC and detected by spectrofluorimetry after post-column derivatization in the Kobra cell® where they are converted into their 9,10-dibromo derivatives (**Figure 3**).

3 Results

3.1 Total fungi isolates from grapes

The fungi of concern were isolated from the 470 grape samples taken during 2005. *Aspergillus* and/or *Penicillium* were present on grapes at both developmental stages: the veraison and the harvesting. The incidence of samples colonised by *Aspergillus* spp. was significantly dominant since from the 510 strains isolated, 487 belong to *Aspergillus* spp. (95.5%), while the number of *penicillia* isolates were 23 representing 4.5% of the total number of isolates (**Figure 4 a**).

Black aspergilli constituted 56.9 % of the 487 *Aspergillus* strains isolated namely *A. niger* aggregates (52.2%), *A. japonicus* (2.9%) and *A. carbonarius* (1.8%) (**Figure 4**

b). However, the outstanding result was the occurrence of *A. flavus* "the Aflatoxin producer" with an isolation rate reaching 43.1% of the total *Aspergillus* strains isolated (**Figure 4b**).

3.2 Mycotoxigenic capacity of fungal isolates

The original result obtained pushed us to test the mycotoxigenic (OTA and AFB1) production by all fungal isolates with a focus on the AFB1 production.

With regard to the ochratoxin A, *A. carbonarius* showed that it is the only species able to produce the OTA with a production capacity reaching 100% and a maximum concentration of 8.38 µg/g CYA. None of the other isolated species showed an OTA-production capacity at a detectable limit (**Figure 5**).

Concerning the AFB1, 43.4 % of the *A. flavus* isolates produced the mycotoxin with concentrations ranging between 0.07µg/g CYA and 22.6 µg/g CYA (**Figure 6**).

3.3 Mycotoxin detection in handmade must

The results of the analysis done on 47 samples of handmade must are summarized in **Table 1**. The results obtained showed that none of the 47 must samples contain the OTA at a detectable limit. However, concerning the AFB1, results show that 40% of these same samples contain this mycotoxin at low level. The most contaminated were 2 samples (4%) reaching a maximum concentration of 0.46 and 0.17 µg AFB1 L⁻¹ respectively. 17 samples (36%) showed traces of AFB1 with concentrations ranging from 0.01 to 0.08 µg AFB1 L⁻¹, whereas this mycotoxin was not detected in 28 (60%) of the must samples. For confirmation of the obtained results, a derivatization of the AFB1 was done after, after post-column derivatization in a Kobra cell® where the AFB1 was converted into its 9,10-dibromo derivatives (Fig 3 a and b).

4 Discussion

In the studies performed on wine grapes mycobiota, black aspergilli namely *A. niger* var *niger* (Abarca *et al.*, 1994) and *A. carbonarius* (Horie, 1995) has been reported in some Mediterranean countries as the predominant fungi especially at harvesting time (Serra *et al.*, 2003; Serra *et al.*, 2005; Bau *et al.*, 2005). In fact, the presence of OTA in must and wine is due to the contamination of grapes by these species (Battilani *et al.*, 2006). In the present study, results showed that all grapes samples were contaminated by two genera *Aspergillus* spp. and/or *Penicillium* spp. with a large predominance of *Aspergillus* spp. (95.5%).

Among the black aspergilli, *A. niger* aggregates remains predominant and this seem to be in agreement with the results observed in the other Mediterranean countries (Abarca *et al.*, 1994; Horie, 1995; Serra *et al.*, 2003; Serra *et al.*, 2005; Bau *et al.*, 2005; Bejaoui *et al.*, 2006) where *A. niger* aggregates are considered as the dominant grapes contaminant. However, and unlike those countries, *A. carbonarius* constitutes a minority in the Lebanese vineyards where the isolation rate of this species is about 1.8% of the total *Aspergillus* isolates while in the other Mediterranean countries its isolates represent up to 48% of the total black aspergilli.

However, the outstanding result was the occurrence of the aflatoxigenic fungus, the *A. flavus* detected in all vineyards with an isolation rate reaching 43.1% of the total *Aspergillus* strains isolated. This species is considered as a non-habitual member of the natural grape mycobiota. Studies conducted in some Mediterranean countries have reported a low incidence of this species in vineyards (Martinez-Culebras and Ramon, 2006; Medina *et al.*, 2005; Melki Ben Fredj *et al.*, 2006). In comparison to our previous work (EL Khoury *et al.*, 2006) on the same vineyards during 2004 where the isolation rate of *A. flavus* was about 12.7%, results of 2005 show that there was an increasing tendency of the vineyards contamination by *A. flavus* isolates (43.1%). This difference in results needs a data analysis (2004 and 2005) in order to enable a better comprehension

of all physico-chemical parameters that influence the contamination of the vineyards and the development of this species.

As for the OTA-producing ability of fungi, *Aspergillus ochraceus* and related species of section *Circumdati* as well as *Penicillium verrucosum* were considered as the main OTA-producing species. Until 1998, they were also believed to be responsible for the production of this toxin in grapes (Ospital *et al.*, 1998). Nevertheless, since the first description of the OTA production by the black aspergilli *A. niger. var niger* (Abarca *et al.*, 1994) and *A. carbonarius* (Horie, 1995), these species have been identified as the major OTA producers in grapes. The results obtained from surveys of OTA-producing fungi on grapes in Spain (Abarca *et al.*, 2001; Cabanes *et al.*, 2002), Portugal (Serra *et al.*, 2003) Italy (Battilani *et al.*, 2003) and France (Bejaoui *et al.*, 2006) showed that *A. carbonarius* is the main OTA-producer and that its ochratoxigenic potential was not occasioned by its intrinsic toxigenic character but also due to its aggressiveness (Battilani *et al.*, 2002). Our results support highly this fact since, from the 487 *Aspergillus* isolates, *A. carbonarius* showed that it is the only species able to produce the OTA with a production capacity reaching 100% while none of the other species isolates showed an ability to produce this mycotoxin at a detectable limit.

With regard to the AFB1 production, 43.4 % of the *A. flavus* isolates showed an ability to produce this mycotoxin with concentrations ranged between 0.07 μ g/g CYA and 22.6 μ g/g CYA which prove another time the aflatoxigenic ability of this species.

The OTA contamination of wine and grape juice has been attracting considerable attention in many countries since the publication of the first results in 1996 (Zimmerli and Dick, 1996). The last regulation of OTA which took effect on April 1, 2005, established a maximum OTA level for wine at 2 μ g/kg (European Union Commission regulation, 2005). In this survey, the natural occurrence of the OTA and the AFB1 in Lebanese grapes was evaluated. Results showed that the OTA was not detected in any of the must samples but, the AFB1 was found in 40% of the same samples.

The absence of the OTA from must samples can be related to the very low incidence of the ochratoxigenic species, the *A. carbonarius* (1.8%) among all isolated strains and to its low ability to produce this mycotoxin. Or, under the optimum conditions of culture in the laboratory, the maximum concentration obtained was 8.38 µg/g CYA which may show the lower ability of the OTA production by these strains. In addition to that, the *A. niger* aggregates isolated from the Lebanese vineyards are considered as none OTA-producers since none of these isolates has produced this mycotoxin at a detectable limit. The OTA absence may be also explained by the fact that probably the presence of an other toxigenic species (in this case the *A. flavus*) with a high incidence (43.1%) and due to its competitive character may possibly restrict the OTA production by *A. carbonarius* but also by the *A. niger* aggregates which are considered as a very low OTA- producers in the field. Bouraima et al (1993) have reported the competition between *A. flavus* and *A. ochraceus*. The occurrence of these two species has led essentially to the production of AFB1. This phenomenon was explicated by the fact that in the biogenesis of the Aflatoxins, *A. flavus* uses the phenylalanine from the support on which it develops. When this species is abundant, it would divert with its profit all the phenylalanine. The OTA, an analogue of phenylalanine could not then be produced.

Concerning the AFB1, the occurrence of this mycotoxin in must seems to be linked to the presence of the aflatoxigenic fungus, the *A. flavus* on grapes in the vineyards. This is related to the fact that the *A. flavus* is the only known AFB1-producing species among all fungi isolates and since that 43.4 % of its isolates have produced the mycotoxin up to a concentration of 22.6 µg/g CYA.

While previous studies have considered that the OTA is the most relevant mycotoxin in must and wine especially in the Mediterranean basin and they focused on the occurrence of black aspergilli on grapes in the field, our survey shows that must derived from some Lebanese vineyards are contaminated by the AFB1 due to the contamination of grapes by the *A. flavus* the non-habitual grape contaminated species. So the implication of *A. flavus*

in winemaking has to be taken into consideration because of the serious health and the economic hazards which can be generated. More information is needed urgently in order to enable a better identification of the environmental conditions that may favor AFB1 production in the field and to apply a control strategy that may reduce the contamination rate by this mycotoxin and to check its content in finished wines.

5 References

Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castella, G., Cabanes, F.J., 1994. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var-*niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2650-2652.

Abarca, M., Accensi, F., Bragulat, M.R., Cabanes, F.J., 2001. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species. *J. Food Prot.* 64, 903-906.

Battilani, P., Magan, N., Logrieco, A., 2006. European research on ochratoxin A in grapes and wine. *Int. J. Food Microbiol.* 111, 1, S2-S4.

Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Languasco, L., Giorni, P., Kozakiewicz, Z.. 2003. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grape grown in Italy. *J. Food Prot.* 66, 633-636.

Battilani, P., Pietri, A., 2002. Ochratoxin A in grapes and wine. *Eur.J.Plant pathol.* 108, 639-643.

Bau, M., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Minguéz, S., Cabañes, F.J., 2005. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 125-130.

Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A., 2006. Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. *Int. J. Food Microbiol.* 111, S46-S52.

Bouraima, Y., Ayi-Fanou, L., Kora, I., Sanni, A., Creppy, EE, 1993. Mise evidence la contamination des cereals par les aflatoxines et l'ochratoxine A au Benin. In Creppy, EE., Castegnaro, M., Dirheimer (Eds). *Human ochratoxicosis and its pathologies.* 231, 101-110.

Burdaspal, P.A., Legarda, T.M., 1999. Ochratoxin A en vinos, mostos y zumos de uva elaborados en Espana y en otros paises europeos Alimentaria. 99, 107-113.

Busby, W.F., Wogan, G.N., 1984. Aflatoxin. In: *Chemical Carcinogens*. ACS. monograph 182 Searle Ed 2 Vol 2, 945-1136. American Chemical Society. Washington DC.

Cabanes, F.J., Accensi, F., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castella, G., Minguez, S., Pons, A., 2002. What is the source of ochratoxin A in wine? *Int. J. Food Microbiol.* 79, 213-215.

Chan, D., MacDonald, S.J., Boughtflower, V., Brereton, P., 2004. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean up liquid chromatography-fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.* 1, 2, 13-16.

Deiner, U.L., Cole, R.J., Sanders, T.H., Payne, G.A., Lee, L.S., Kich, M.A., 1987. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Ann.Rev.Phytopathol.* 25, 240-270.

El Adlouni, C., Tozlovanu, M., Naman, F., Faid, M., Pfohl-Leszkowicz, A., 2006. Preliminary data on the presence of mycotoxins (Ochratoxin A, citrinin and aflatoxin B1) in black table olives" Greek style" of Moroccan origin. *Mol.Nutr.Food Res.* 50, 507-512.

EL Khoury, A., Rizk, T., Lteif, R., Azouri, H., Delia, M-L., Lebrihi, A., 2006. Occurrence of ochratoxin A and aflatoxin B1-producing fungi in Lebanese grapes and OTA content in musts and finished wines during year 2004. *J.Agric.Food Chem.* 54(23), 8977-8982.

European Union Commission regulation (EC) No 123/2005 of 26 January 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A. (Legislation L025, January 28, 2005). Off.J.Eur.Union.48, 3-5.

Gareis, M., Scheuer, R., 2000. Ochratoxin A in meat and meat products. Arch.Lebensmittelhyg. 51, 102-103.

Goto, T., Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D., 1997. Mycotoxin producing ability of *Aspergillus tamarii*. Mycotoxins. 44, 17-20.

Gourama, H., Bullerman, L.B., 1995. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds. J.Food Prot. 58, 1395-1404.

Horie, Y., 1995. Productivity of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus section nigri*. Nippon Kingakukai Kaiko. 36, 73-76.

Hubner, M., Vrabcheva, T., Gareis, M. Simultaneous detection of ochratoxin A and B in spices and herbs by immunoaffinity column cleanup and HPLC. Recueil Medecine Veterinaire **1998.**, pp 507.

IARC., 1993. Ochratoxin A. In *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*, International Agency for Research on Cancer: Geneva, Switzerland. 56, 26-32.

Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D., Goto, T., 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus section flavi*. Mycol.Res. 105, 233-239.

Jørgensen, K., 1998. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. Food Addit. Contam. 15, 550-554.

Jelinek, C.F., Pohland, A.E., Wood, G.E., 1989. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds (an update). *J.Assoc.Off.Anal.Chem.* 72, 223-230.

Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M., 1989. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Envir. Sci.* 2, 179-248. (ABSTRACT).

Kutzman, C.P., Horn, B.W., Hesseltine, C.W., 1987. *Aspergillus nominus*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaritii*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 53, 147-158.

Micco, C., Grossi, M., Miraglia, M., Brera, C., 1989. A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted beans. *Food Addit. Contam.* 6, 333-339. (ABSTRACT).

Martinez-Culebras, P.V., Ramon, D., 2007. An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. *Int. J. Food Microbiol.* 113(2), 147-153.

Medina, A., Mateo, R., Lopez-Ocana, L., Valle-Algarra, F.M., Jimenez,, 2005. M. Study of Spanish Grape Mycobiota and ochratoxin A Production by Isolates of *Aspergillus tubingensis* and Other Members of *Aspergillus* section Nigri. *Appl Environ Microbiol.* 71, 4696-4702.

Melki Ben Fredj, S., Chebil, S., Lebrihi, A., Ghorbel, A., Mliki, A., 2007. Occurrence of pathogenic fungal species in Tunisian vineyards. *Int. J. Food Microbiol.* 113(3), 245-250

MacDonald, S., Wilson, P., Barnes, K., Damant, A., Massey, R., Mortby, E., Shepherd, M.J., 1999. Ochratoxin A in dried fruit: method development and survey. *Food Addit. Contam.* 16, 253-260.

Miller, J.D., Trenholm, H.L., 1994. Mycotoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxins. Eagan Press: St Paul, MN.

Ospital, M., Cazabeil, J.M., Betbeder, A.M., Tricard, C., Creppy, E., Medina, B., 1998. L'ochratoxine A dans les vins. *Revue Française d'Oenologie*. 169, 16-18.

Otteneder, H., Majerus, P., 2000. Occurrence of ochratoxin A in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Addit. Contam.* 17, 793-798.

Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N., Castegnaro, M., 2000. Balkan endemic nephropathy and the associated urinary tract tumors: review on etiological causes, potential role of mycotoxins. *Food Addit. Contam.* 19, 282-302.

Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L., Piva, G. 2001. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Addit. Contam.* 18, 647-654.

Pitt, J.I., Hocking A.D., 1997. (Eds) *Fungi and food spoilage*. Blackie, London.

Pitt, D.B, Plestina, J.I, Shepard, R, Solfrizzo, G, Vergere, M, Walker, P.J.P., 2001. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. In *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)*, Food and Agriculture Organization, Rome, **2001**, Series 47. pp 281-415.

Pohland, A.E., Nesheim, S., Friedman, L., 1992. Ochratoxin A: a review. *Pure Appl. Chem.* 64, 1029-1046. (ABSTRACT)

Speijers, G.J.A., Van Egmond, H.P., 1993. World-wide ochratoxin A levels in food and feeds. In *Human Ochratoxicosis and its Pathologies*, Creppy, E., Castegnaro, M., Dirheimer, G., John Liebbey Eurotext Ltd., Paris. 85-100.

Sage, L., Krivobok, S., Delbos, E., Seigle-Murandi, F., Creppy, E.E., 2002. Fungal flora and Ochratoxin A production in grapes and musts from France. *J. Agri. Food Chem.* 50, 1306-1311.

Serra, R., Bragua, A., Venancio, A., 2005. Mycotoxin producing and other fungi isolated from grapes for wine production with particular emphasis on Ochratoxin A. *Research Microbiol.* 156, 515-521.

Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z., Venancio, A., 2003. Black *Aspergillus* species as Ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 63-68.

Sharma, R.P., Salunkhe, D.K., 1991. (Eds). *Mycotoxins and Phytoalexins*. CRC Press. Boca Raton, USA.

Stroka, J., Anklam, E., 2002. New strategies for the screening and determination of aflatoxins and the detection of aflatoxin-producing moulds in foods and feeds. *Trends Anal. Chem.* 21, 90-95.

Trucksess, M.W., Giler, J., Young, K., White, K.D., Page, S.W., 1999. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee-1997. *J. AOAC Int.* 82, 85-89.

Visconti, A., Pascale, M., Centonze, G., 1999. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 864, 89-101.

Wang, J.S., Kensler, T.N., Groopman, J.D., 1998. Toxicants in Food: Fungal contaminants. In: *Current Toxicology Series. Nutrition and Chemical Toxicity, Ionnides C* (Ed) John Wiley and Sons. New York, 29-57.

Zimmerli, B., Dick, R., 1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment. *Food Addit. Contam.* 13, 655–668.

Figure Captions

Figure 1. Origin of samples from Bekaa valley. ¹ ksara, ² Tanayel, ³ Itany, ⁴ Mansoura, ⁵ Tal Dnoub, ⁶ Kefraya, ⁷ Kanafar.

Figure 2. HPLC Chromatograms ($\lambda = 362\text{nm}$) of an Aflatoxin B1 standard (a) and an extract from must sample (b). UV spectra of Aflatoxin B1: $\lambda = 225, 267$ and 362 nm .

Figure 3. HPLC Chromatograms of a derivatized Aflatoxin B1 standard (a) and extract from must samples (b) after post-column derivatization by Kobra cell®. ($\lambda_{\text{ex}} = 362\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 425\text{ nm}$).

Figure 4. a- Occurrence of *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. from all maturation stages, **b-**The isolation rates of species belonging to *Aspergillus* spp.

Figure 5. The production capacity of OTA by all fungal isolates. ND = Not Detected

Figure 6. The production capacity of the AFB1 by all fungal isolates. ND = Not Detected.

Table 1. Contamination rate of 47 handmade musts by OTA and AFB1

Concentration range $\mu\text{g Mycotoxin L}^{-1}$	OTA content		AFB1 content	
	Total of samples	Maximum concentration $\mu\text{g OTA L}^{-1}$	Total of samples	Maximum concentration $\mu\text{g AFB1 L}^{-1}$
0.1-0.5	0	-	2	0.46
<0.05-0.1	0	-	6	0.08
0.01-0.05	0	-	11	0.04
<DL ^a	47	-	28	-

^aDL= detection limit

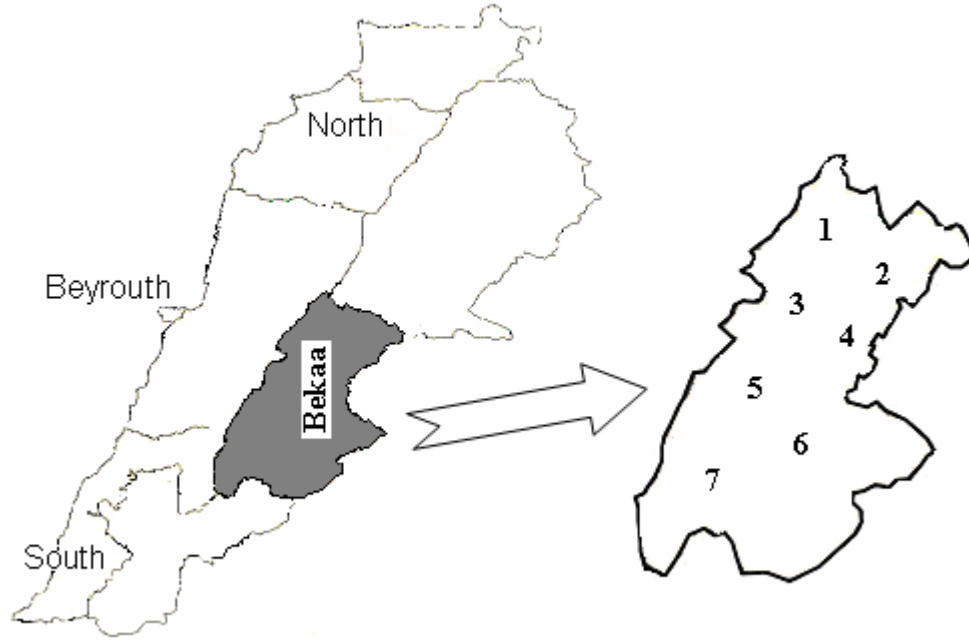


Figure 1

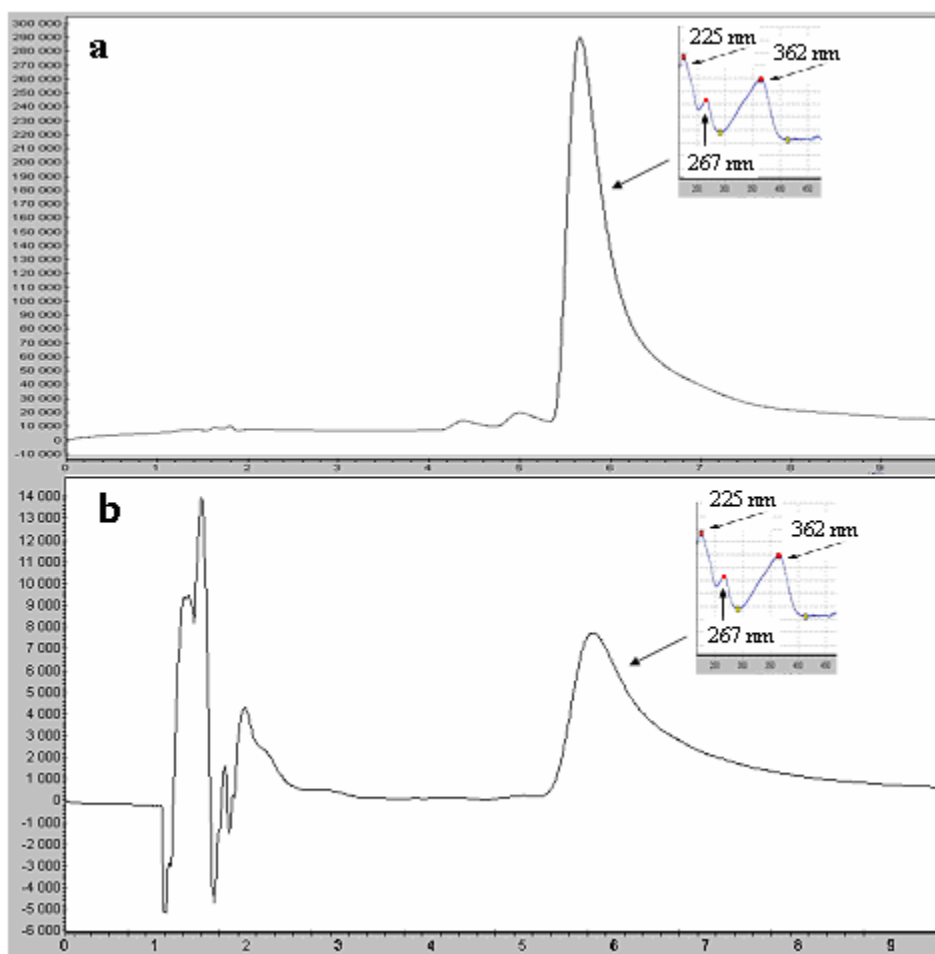


Figure 2

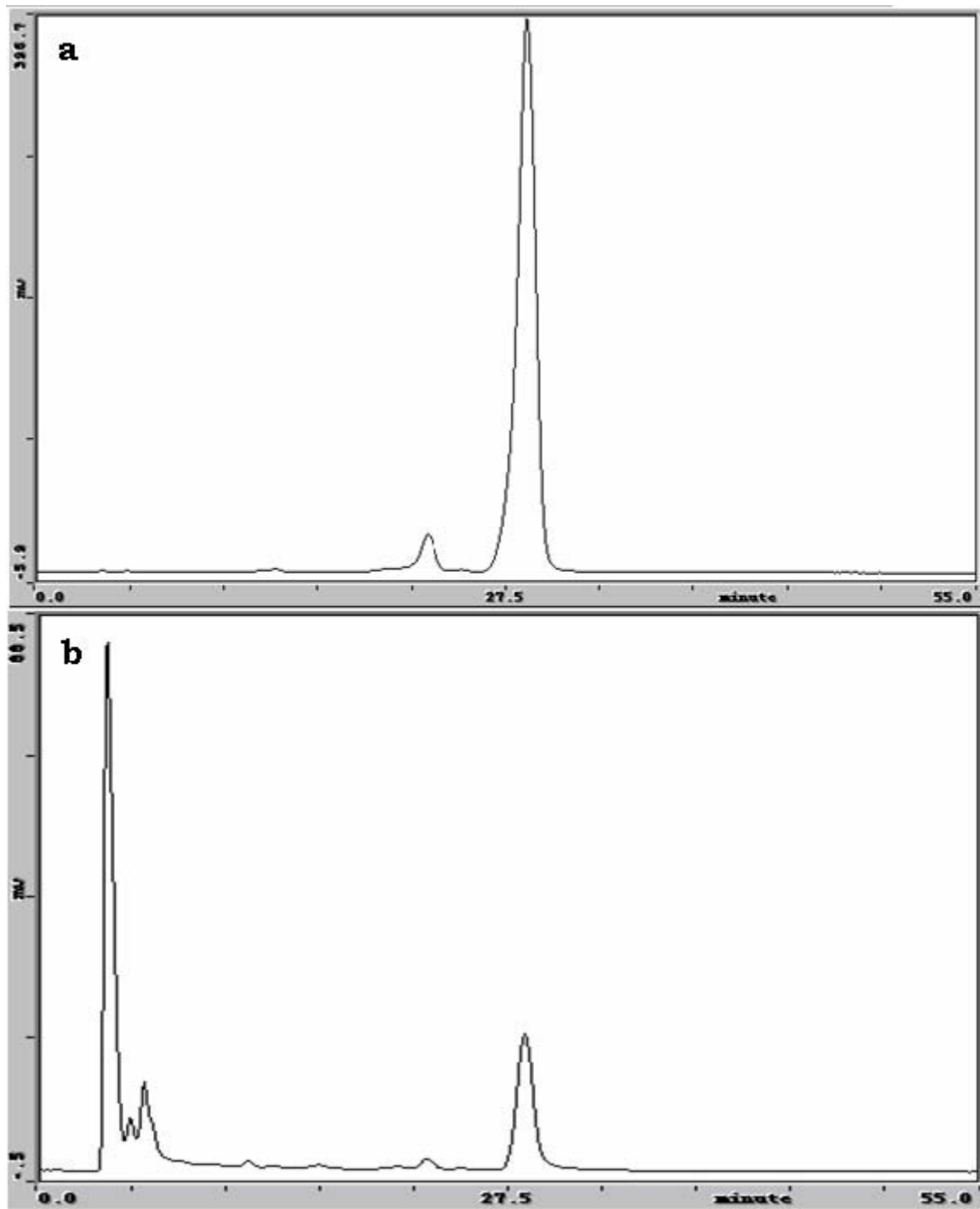


Figure 3

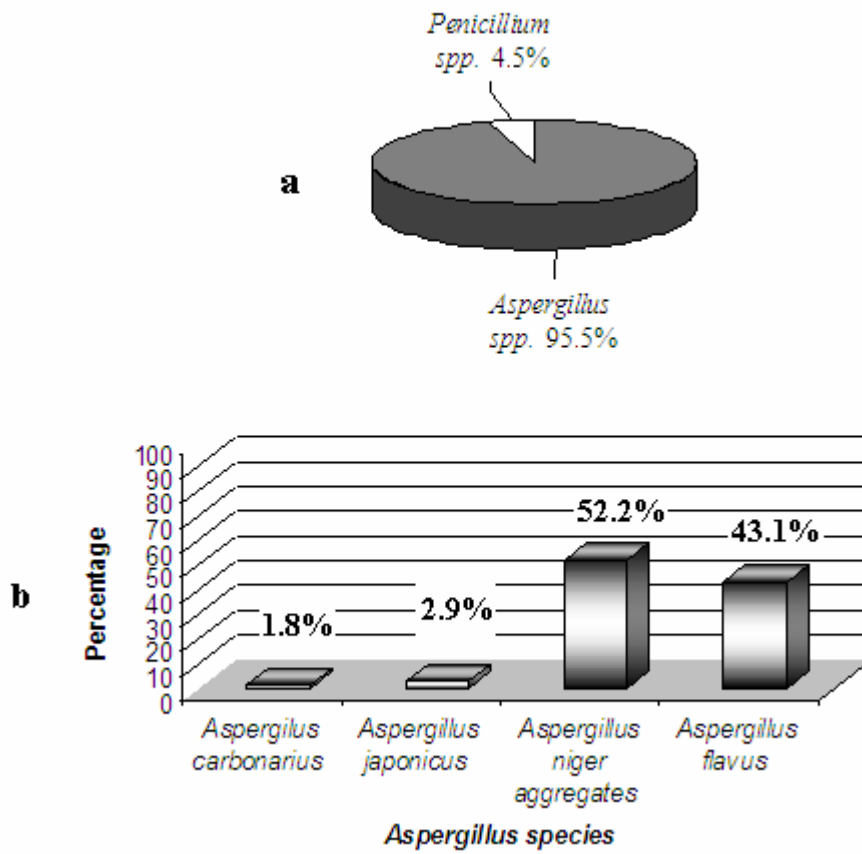


Figure 4

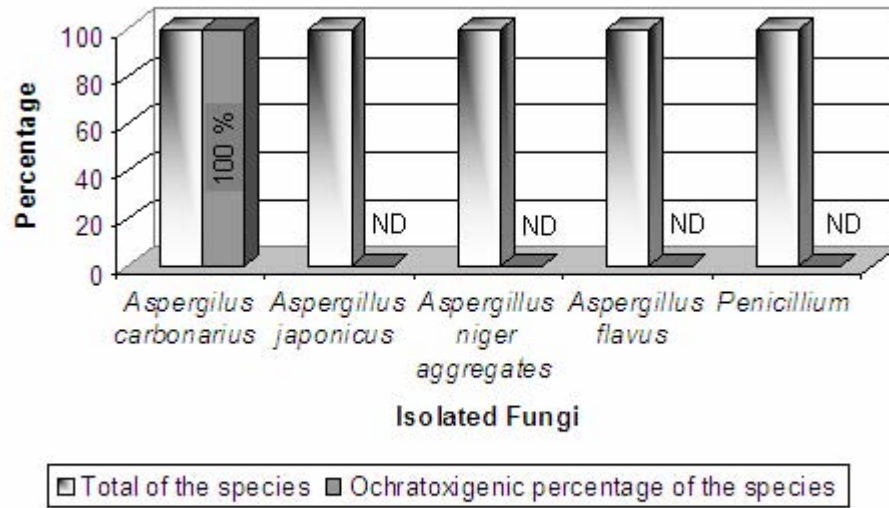


Figure 5

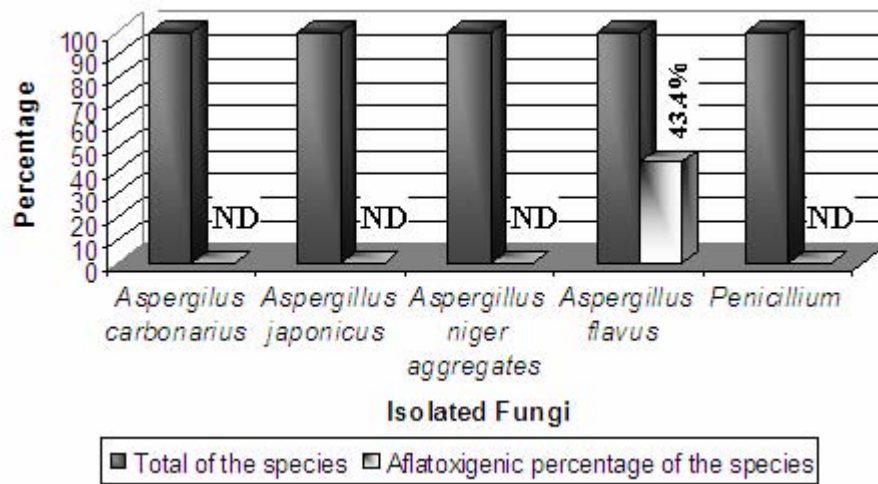


Figure 6

III-7. Etude de la croissance des souches aflatoxinogènes sur milieu modèle

La température et l'activité de l'eau (A_w) jouent un rôle primordial sur le développement des populations fongiques et par suite de leur toxino-génèse. Le but de cette expérimentation a été donc d'étudier l'influence de ces deux facteurs environnementaux majeurs et de leur interaction, sur la vitesse de croissance de 3 souches aflatoxinogènes de la section *flavi* isolées des baies sur milieu SGM, milieu synthétique possédant presque les mêmes constituants que des raisins à maturité. Ceci a été réalisé afin d'identifier la température et l' A_w optimales ainsi que leur interaction sur la croissance des souches choisies.

Chaque facteur a donc été étudié à différents niveaux : 3 niveaux de température (18°C ; 30°C et 37°C) ainsi que 3 niveaux d' (A_w) (0.9 ; 0.95 ; 0.99). Pour un plan d'expérience complet, 27 tests seraient nécessaires.

Dans le cas de la température et, en fixant chaque fois l'activité de l'eau (A_w) à une des trois valeurs testées, les niveaux donnant les meilleures croissances en fonction du temps se classent dans l'ordre décroissant suivant : 37°C ; 30°C et 18°C. Les résultats obtenus étaient similaires pour les 3 souches testées (Fig. 35). A noter toutefois qu'avec le temps, les profils de croissance deviennent plus ou moins similaires pour les températures de 30°C et 37°C et que la croissance de chacune des souches atteint son point maximal presque au bout du même temps pour ces deux températures testées. Généralement il a été rapporté que les espèces appartenant à la section *flavi* sont capables de se développer à des températures comprises entre 10°C et 48°C avec une croissance optimale vers $T= 33^\circ\text{C}$ (Domsch *et al.*, 1980). Les résultats obtenus concernant des souches de la section *flavi* isolées à partir des vignobles Libanais et cultivées sur milieu synthétique, obéissent généralement aux mêmes conditions de développement en fonction de la température où les croissances optimales se situent entre les températures 30°C et 37°C.

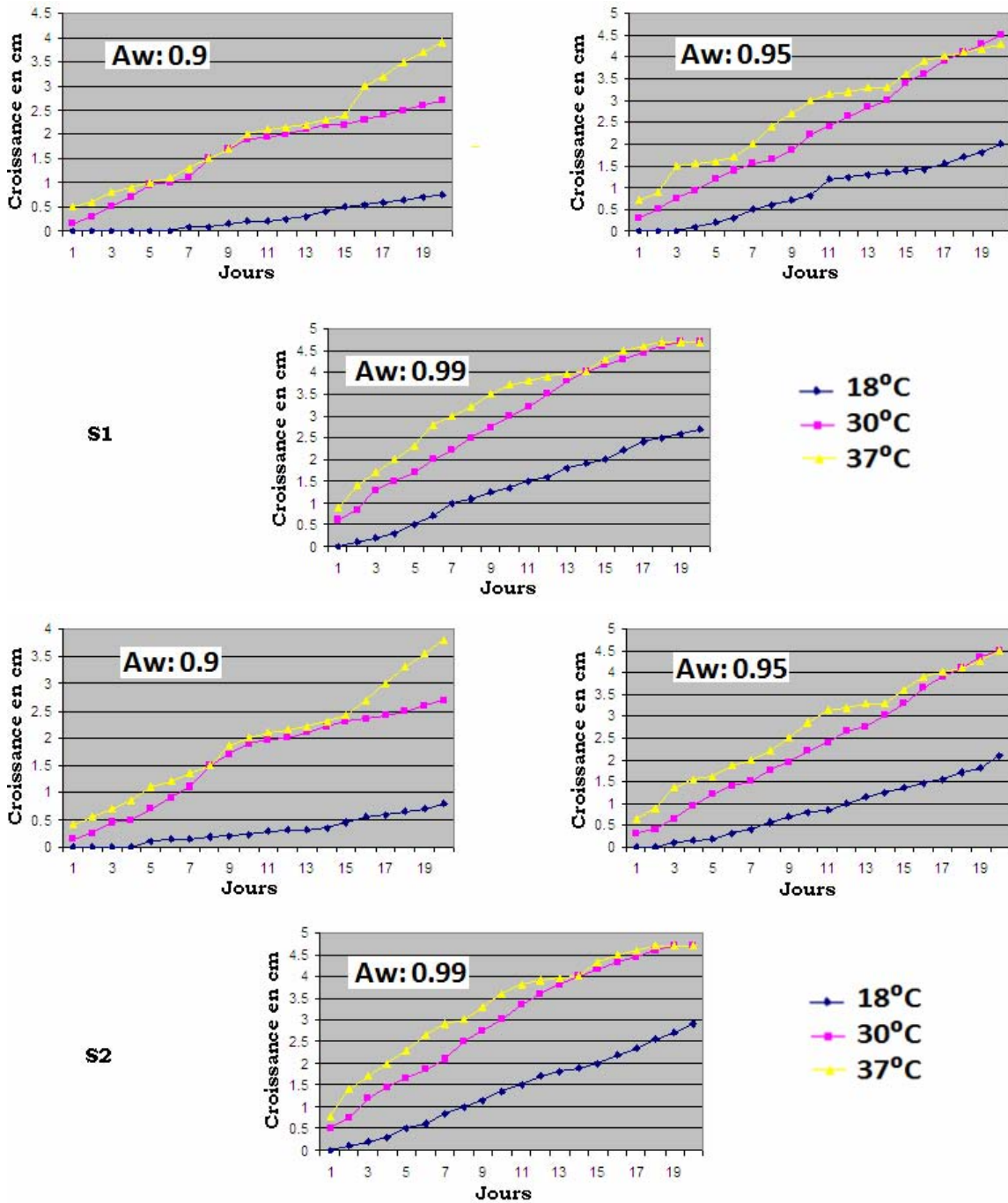


Figure 35 : Croissance des souches en fonction de la température. S1 : Souche 1 ;
S2 : souche 2

Concernant l'activité de l'eau, et en fixant cette fois la température pour chacune des trois valeurs testées, la croissance décroît dans l'ordre suivant: 0.99 ; 0.95 ; 0.9. Toutefois, une

similarité existait entre les profils de croissance des 3 souches testées (Figure 36). Ayerst (1969) a rapporté que les espèces de la section *flavi* sont capables de se développer à une (A_w) minimale de 0.78 à 0.80. Les résultats obtenus montrent que la croissance devient de plus en plus rapide en augmentant l'activité de l'eau pour arriver à une valeur optimale à 0.99.

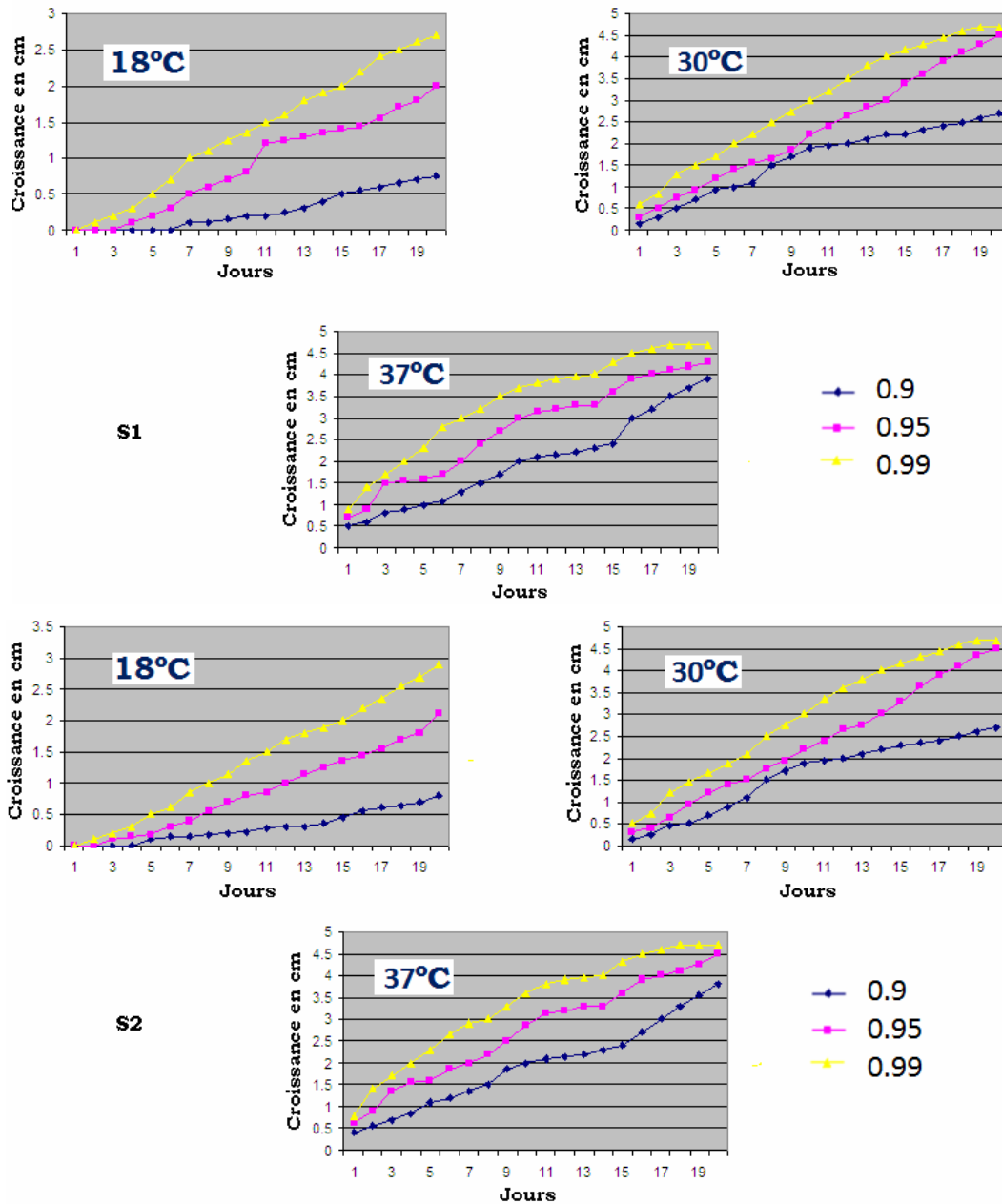


Figure 36 : Croissance des souches en fonction de l' A_w . S1 : Souche 1 ; S2 : souche 2

Toutefois ces résultats indiquent de nouveau que les espèces de la section *flavi* sont capables de pousser sur un large spectre d' A_w qui est le facteur le plus déterminant dans le développement des champignons et dont les valeurs minimales doivent être connues dans le but de limiter au maximum la croissance de micro-organismes de détérioration.

L'interaction (A_w -T°C) constitue un facteur critique dans la croissance des champignons et détermine ainsi leur capacité toxigène. Indépendement l'un de l'autre, des valeurs optimales de croissance des 3 souches testées ont été retenues pour chacun de ces deux facteurs. Cependant, l'interaction (A_w -T°C) a montré que la croissance optimale la plus rapide correspond aux valeurs optimales retenues des deux facteurs ce qui est logique dans le cas de développement.

III-8. Etude de la production de l'AFB1 sur milieu modèle

Les résultats obtenus concernant l'analyse de la production de l'AFB1 par 3 souches aflatoxinogènes sur le milieu SGM sont montrés dans le tableau 19.

Tableau 19 : Production de l'AFB1 en $\mu\text{g/g}$ SGM par 3 souches de la section *flavi* en fonction de l' A_w , la température et le temps

		Temp	18°C	30°C	37°C
		A_w			
S1 10 j	0.9		0	0	0
	0.95		0	2.2	0
	0.99		0	3.5	1.7
S1 20 j	0.9		0	0	0
	0.95		0	3.4	0
	0.99		0	4.2	2.1
S2 10 j	0.9		0	0	0
	0.95		0	1.8	0.9
	0.99		0	2.7	1.3
S2 20 j	0.9		0	0	0
	0.95		0	2.6	1.4
	0.99		0	3.9	1.8
S3 10 j	0.9		0	0	0
	0.95		0	2.7	1.3
	0.99		0	3.6	2.1
S3 20 j	0.9		0	0	0
	0.95		0	3.8	1.8
	0.99		0	5	2.9

De nouveau, l'activité de l'eau, la température ainsi que leur interaction montrent que ces facteurs influencent à des valeurs bien précises la capacité des champignons à produire les mycotoxines. En dessous de ces valeurs, les champignons sont incapables de produire ces molécules toxiques. Pour l'activité de l'eau, le niveau 0.99 correspond à la plus forte toxogénèse. Pour la température, 30°C était la valeur optimale de production. Au-delà de 30°C une diminution dans la capacité des souches à produire l'AFB1 était remarquée. A noter que la température optimale retenue pour la production de l'AFB1 n'était pas la même pour la croissance des champignons.

Dans le but de déterminer l'influence de chaque facteur sur la production de l'AFB1, nous avons étudié statistiquement l'impact de chacun de ces facteurs indépendamment de l'autre, puis nous avons déduit l'interaction (Aw-T°C). Les résultats sont résumés dans le tableau 20.

Tableau 20 : Traitement statistique des résultats obtenus concernant la production de l'AFB1 en fonction de la température et l'Aw ainsi que leur interaction

S1	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value
AW	21.01092896	8.215969545	2.557328	0.021
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value
Temp	0.048947052	0.044095069	1.110034576	0.283
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value
Temp	0.048947052	0.037760949	1.29623468	0.214
AW	21.01092896	8.046701078	2.611123336	0.019
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value
S2				
AW	17.82786885	6.907964	2.58077	0.020
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value
Temp	0.040794224	0.037206	1.096432	0.289
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value
Temp	0.040794224	0.03178	1.283633	0.218
AW	17.82786885	6.772247	2.632489	0.018
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value
S3				
AW	25.45081967	9.016725264	2.822623395	0.012
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value
Temp	0.085288809	0.04719406	1.807193712	0.089
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value
Temp	0.085288809	0.037746581	2.259510841	0.039
AW	25.45081967	8.043639269	3.164092623	0.006

De ce tableau, on s'intéresse à la valeur (P) (P-value <0.05) (il faut qu'elle soit inférieure à 0.05 pour que le résultat soit significatif), on peut déduire qu'indépendamment l'un de l'autre, chaque facteur influence le pouvoir de production des souches testées. Cependant, l'influence de l'activité de l'eau s'avère beaucoup plus critique que celle de la température. Et, dans le cas de l'interaction ($A_w-T^{\circ}C$), on remarque que le facteur (A_w) est le plus influençant sur la capacité des champignons à produire l'AFB1.

De cette étude, on a pu prouver une nouvelle fois que les facteurs température, Activité de l'eau ainsi que leur interaction sont des facteurs déterminants dans la croissance des champignons mais qu'ils sont aussi les facteurs les plus critiques influençant le pouvoir toxigène des champignons. Fortement, il apparaît nettement que le facteur (A_w) affecte profondément les seuils de croissance ainsi que la toxigénèse des souches et que cet effet a un impact plus décisif que celui de la température. Toutefois, l'interaction ($A_w-T^{\circ}C$) est une donnée prépondérante à tenir, or la croissance et la toxigénèse des champignons nécessitent l'intervention de ces deux facteurs qui agissent en synergie pour définir les seuils.

Enfin, les souches aflatoxinogènes isolées des vignobles libanais semblent posséder les mêmes caractéristiques physiologiques que celles déjà connues et que les seuils de température ainsi que de l'activité de l'eau nécessitant leur croissance et définissant leur caractère toxigène sont très similaires à ceux définis. Toutefois, une certaine spécificité de chaque souche peut être établie. Cette étape nous donne une idée sur le comportement de ces champignons vis-à-vis de ces facteurs. Cependant, la complexité des facteurs agissant au niveau du vignoble requiert des tests supplémentaires afin de mieux comprendre et prévoir la réaction des champignons dans leur milieu naturel.

III-9. Caractérisation moléculaire des isolats de la section *flavi* par PCR-RFLP

Cette partie donne un aperçu des méthodes moléculaires utilisées en taxonomie fongique. En effet, il est impossible de discuter de la taxonomie des champignons sans citer les techniques moléculaires qui ont connu un progrès important et ont suscité un intérêt énorme grâce à l'émergence de la biologie moléculaire.

Lorsque les caractéristiques morphologiques sont insuffisantes pour identifier un champignon, on utilise les techniques physiologiques et biochimiques. Cependant, pour des champignons filamenteux tels que les genres *Penicillium* ou *Aspergillus*, ces méthodes sont laborieuses, longues et quelques fois incomplètes (Andersen, Thrane, 1996; Frisvad *et al.*, 1998 ; Guarro *et al.*, 1999). Les méthodes moléculaires sont universellement applicables et permettent d'explorer le polymorphisme à différents niveaux (comparaison entre des souches, des espèces, des genres, etc...).

Ces dernières sont basées sur l'étude d'un gène (locus), d'un fragment d'ADN défini (espaceur, intron, etc.), et de plusieurs gènes (multiloci) ou encore de l'ADN total dépendant du but poursuivi.

Les méthodes utilisées pour l'étude de l'ADN total reposent sur la détermination du contenu en bases guanine et cytosine de l'ADN nucléaire ou l'étude du taux d'hybridation de l'hétéroduplex ADN-ADN, dont un brin appartient à l'organisme indéterminé et l'autre à un organisme de référence. Cet hétéroduplex est comparé à l'homoduplex des souches hybridées avec elles-mêmes.

Les méthodes basées sur l'étude d'un gène ou de plusieurs gènes utilisent la technique PCR (Mullis *et al.*, 1986). Cette technique permet l'amplification de séquences spécifiques d'ADN *via* sa synthèse *in vitro* et l'obtention rapide et simple de microgrammes de l'ADN ciblé. L'une des premières applications de cette technique en mycologie a été réalisée par White *et al.* (1990) concernant l'amplification et le séquençage de l'ADN ribosomal fongique pour établir une relation taxonomique et phylogénétique. Les séquences de l'ADN ribosomal contiennent

des régions conservées et variables, leur évolution permet d'étudier l'évolution du génome d'un organisme.

De grandes variations génétiques sont trouvées dans les parties non codantes, ITS et IGS, ce qui permet leur utilisation dans les études de population et les études phylogénétiques des champignons filamenteux (Henry *et al.*, 2000; Mirete *et al.*, 2003, 2004; Parenicova *et al.*, 2001; Varga *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2001). En plus, les ITS et les IGS sont largement utilisés pour la fabrication des amorces spécifiques permettant de différencier les espèces mycotoxinogènes appartenant aux genres *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium* (Lorens *et al.*, 2006 ; Gonzalez-Jaen *et al.*, 2004; Patino *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2001, Patino *et al.*, 2005 ; Pedersen *et al.*, 1997). D'autres séquences de l'ADNr comme 18S rADN, 28S rADN et l'ADNr mitochondrial sont aussi utilisés pour la fabrication des amorces spécifiques (Edel, 1998).

La PCR-RFLP (polymorphisme de taille des fragments de restriction) (digestion de l'ADN par des enzymes de restriction) et le séquençage précédé d'une PCR sont basés sur l'étude d'un gène ou d'un fragment d'ADN (Frisvad *et al.*, 1998 ; Kano *et al.*, 2000). Plusieurs auteurs ont utilisé un fragment de l'ADN ribosomal (Frisvad *et al.*, 1998) telles que les unités 5.8S (très conservées), 18S et 25S (très conservées mais plus utiles que 5.8S), les espaceurs (interne ou externe qui sont des régions non codantes et variables) (Lübeck *et al.*, 2000 ; Makimura *et al.*, 2001) ou encore, « l'intergenic spacer » (IGS) qui sépare deux copies de l'ADN ribosomal. L'avantage de la PCR-RFLP est qu'elle peut être très utile lors d'un criblage d'isolats suspectés appartenir à la même souche ou espèce.

Dans cette partie, notre objectif était de pouvoir identifier, comparer, et par suite détecter les espèces productrices d'AFB1 par PCR-RFLP, sans passer par les techniques de détection des champignons par dénombrement sur boîtes de pétri, suivies d'une identification et d'une classification des souches, (qui est difficile dans le cas de la section *flavi*) ainsi que la détermination du pouvoir toxigène par HPLC-FLD.

Au total, 30 souches d'*Aspergillus* section *flavi* ont été testées dans cette étude. Celles-ci ont été isolées durant les campagnes d'échantillonnage (2004-2005) des vignobles libanais. Leur sélection a été basée sur leur capacité aflatoxinogène (forte, moyenne et faible) ou non-aflatoxinogène et sur les différences morphologiques, (macro et microscopiques : unisériée,

Ces souches ont été repiquées sur milieu CYA à 20°C pendant 3 jours, ce qui a permis le développement d'un mycélium blanc à partir duquel l'extraction de l'ADN génomique de chaque souche a été faite (Liu *et al.* 2000).

Les études ont été ensuite menées dans le but de trouver des variations génétiques entre les espèces susceptibles de les différencier. Ce travail a été basé dans un premier temps sur la région ITS, (ITS₁ : 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3' et ITS₄ : 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') qui a montré une certaine variabilité entre les deux espèces *A. flavus* et *A. parasiticus*. L'utilisation de l'enzyme de digestion (HaeIII) a permis de couper la séquence ITS amplifiée (595 Pb) d'*A. flavus* en 7 fragments alors que celle d'*A. parasiticus* est découpée en 8 fragments. Cependant, vu que la différence entre ces deux espèces se trouvait au niveau des bandes de très faibles poids moléculaires (<20Pb), il fut donc impossible de visualiser ces fragments après migration sur gel, il a donc été impossible de distinguer s'il y avait une différence entre les espèces (Figure 37).

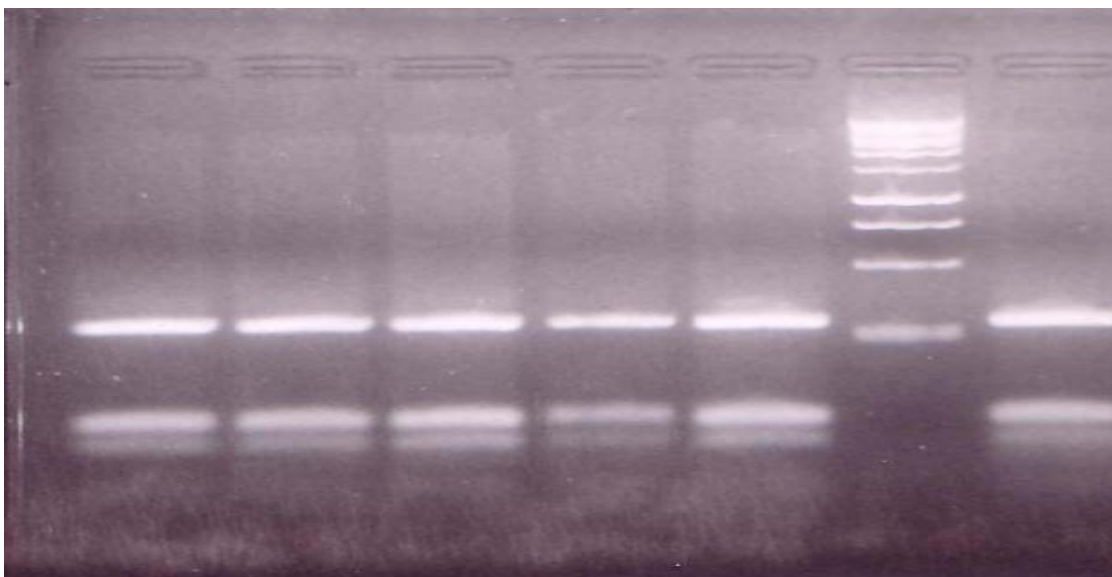


Figure 37 : Electrophoretogramme montrant le résultat de digestion de la séquence ITS (ITS₁-ITS₄) amplifiée à partir de l'ADN génomique des souches de la section flavi, par l'enzyme HaeIII

Le choix s'est fixé alors sur une autre région non codante : la région IGS (690 Pb) (IGSF : 5' AAG GAA TTC AGG AAT TCT CAA TTG 3' et IGSr : 5' GTC CAC CGG CAA ATC GCC GTG CG 3')(Figure 38) localisée entre les deux gènes aflR et aflJ (appartenant au groupe de gènes impliqués dans la

production de l'AFB1) qui est une région non codante et qui a montré une variabilité considérable (2.5%) après alignement des deux régions IGS des espèces références *A. flavus* (SK 20) et *A. parasiticus* (Strain 2999) (Ehrlich *et al.*, 2006) (Figure 39).

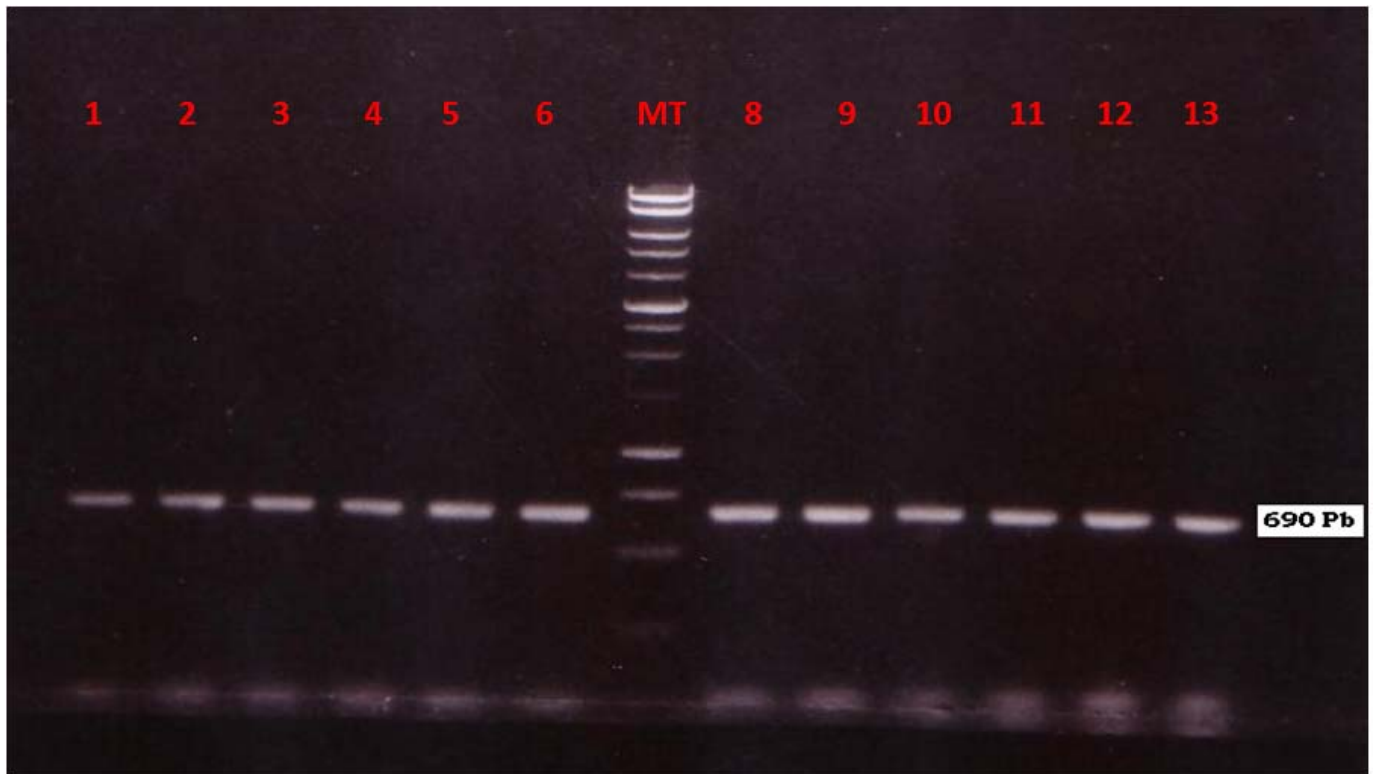


Figure 38: Electrophoretogram montrant le résultat de l'amplification de la séquence IGS (690 Pb) (IGS_F : 5' AAG GAA TTC AGG AAT TCT CAA TTG 3' et IGS_R : 5' GTC CAC CGG CAA ATC GCC GTG CG 3') des souches isolées de la section flavi.

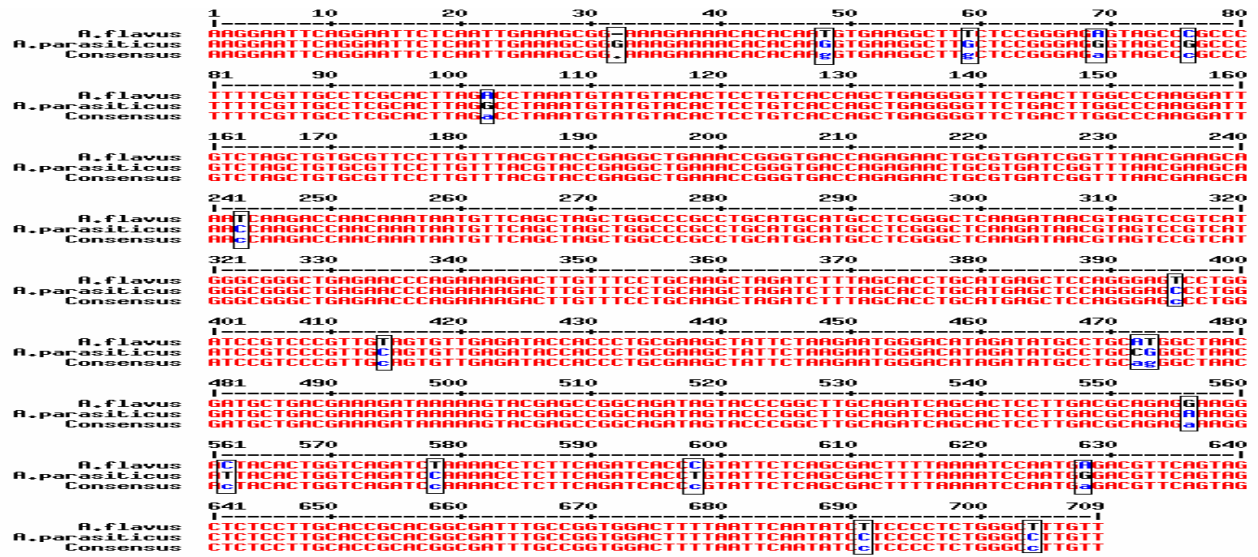


Figure 39 : Alignement entre les régions IGS (afIR-afIJ) des deux espèces références *A. flavus* (SK 20) et *A. parasiticus* (Strain 2999) et les variations génétiques qu'il a montré.

Une comparaison détaillée des cartes de restriction de l'espaceur intergénique (IGS) des deux espèces, a permis l'identification d'une enzyme de restriction (Bgl II), qui pourrait être employée pour les différencier entre elles. Selon l'analyse des cartes, deux sites de restriction pour Bgl II dans la séquence IGS d'*A. flavus* ont été identifiés, et qui doivent couper le produit de PCR en trois fragments de : 362, 210 et 118 pb. Cependant, un seul site de restriction pour cette même enzyme a été identifié pour la séquence IGS d'*A. parasiticus*, qui devrait produire deux fragments de : 363 et 327 pb (Figure 40).

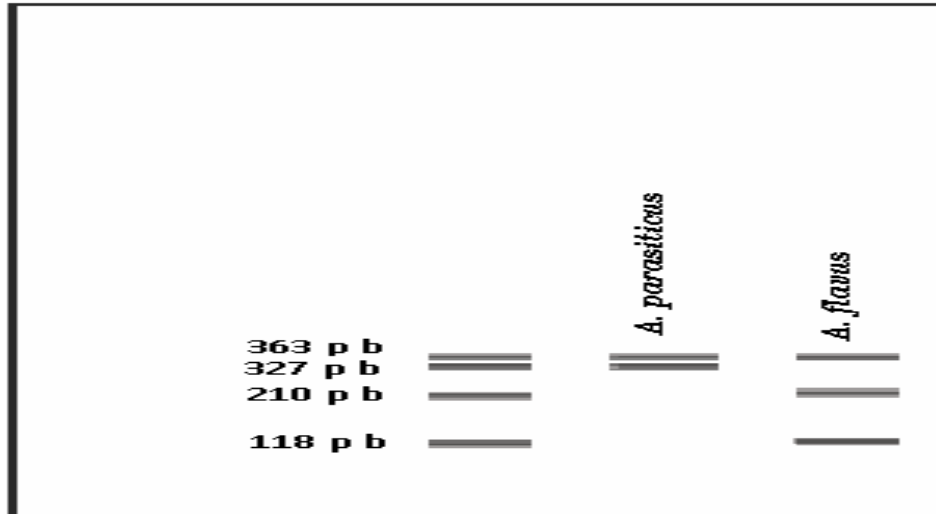


Figure 40: migration théorique (CLC workbench program) du produit PCR après restriction de la séquence IGS (690 Pb) par l'enzyme Bgl II des deux espèces *A. flavus* (SK 20) et *A. parasiticus* (Strain 2999).

La différenciation entre *A. flavus* et *A. parasiticus* s'avère très importante en raison des différences qu'elles montrent vis-à-vis la production des aflatoxines. Or, *A. flavus* produit les aflatoxines du type « B » alors que *A. parasiticus* est capable de produire les deux Types d'aflatoxines « B » et « G ».

Vu la grande différence obtenue, une PCR-RFLP a été réalisée dans les conditions citées précédemment. Par comparaison à la migration théorique (Logiciel : CLC workbench program) le résultat obtenu nous a permis d'identifier un seul isolat d'*A. parasiticus* alors que tous les autres isolats appartenaient à l'espèce *A. flavus* (Figure 41).

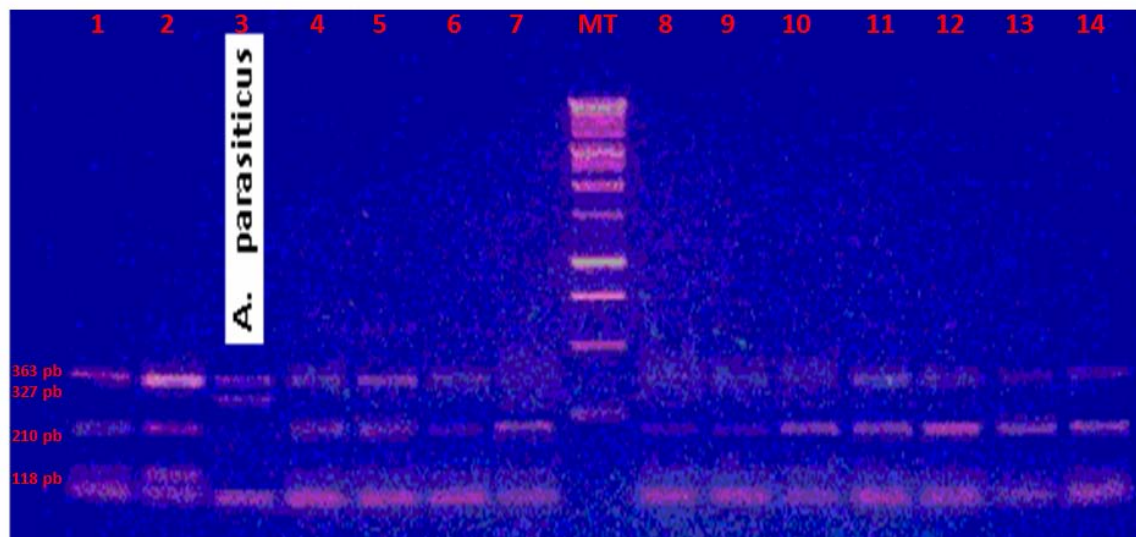


Figure 41: Electrophoretogram montrant le résultat de la digestion de la séquence IGS amplifiée à partir de l'ADN génomique des souches isolées de la section *flavi*.

La méthode conventionnelle d'identification des espèces appartenant à la section *flavi* du groupe *Aspergillus* demande environ entre 2 à 3 jours, mais toutefois, cette méthode reste incapable de différencier entre ces espèces, et surtout entre les deux plus importantes de cette section : *A. flavus* et *A. parasiticus*, qui sont connues pour leurs capacités aflatoxinogènes. En suivant la technique de PCR-RFLP, il a donc été possible de différencier entre ces deux espèces les plus généralement présentes dans les alimentations contaminées et de les identifier sans impliquer toutefois les procédures longues de classification taxonomique.

Morphologiquement, *A. flavus* donne des conidies plus ou moins rudes produites souvent à partir des têtes comportant des métules et des phialides (Bisériée), alors que les conidies d'*A. parasiticus* sont clairement rudes, et la plupart des têtes comportent seulement des phialides (unisériée) (Pitt et Hocking, 1985). Dans ce cas, les résultats de la PCR-RFLP corrélant avec des caractéristiques morphologiques et biochimiques particulières, peuvent être employés pour caractériser des empreintes génétiques des espèces (Michelmore et Hulbert, 1987).

Dans cette étude basée sur la PCR-RFLP, les deux espèces *A. flavus* et *A. parasiticus* ont pu être différenciées. Le modèle de PCR-RFLP obtenu avec Bgl II a pu donc montrer les différences existantes pour les distinguer entre elles. Cependant, la présente étude n'a pas permis la comparaison entre les souches aflatoxinogènes et non aflatoxinogènes.

La technique PCR-RFLP semble être plus simple, plus rapide et moins coûteuse que les techniques conventionnelles de séquençage des produits PCR suivies par des comparaisons au niveau des séquences pour détecter les variations génétiques.

Malgré les diverses méthodes décrites en littérature, il reste toutefois qu'une méthode persuasive pour différencier entre toutes les espèces appartenant à la section *flavi* manque toujours. Par conséquent, une technique simple et rapide pour différencier les espèces de cette section reste toujours à développer. Les différentes études citées impliquent des PCR monomériques ou des PCR multiplex utilisées dans le but de détecter des souches aflatoxinogènes d'*A. flavus* et d'*A. parasiticus*, mais toutefois ces méthodes nécessitent une optimisation dans le but de pouvoir différencier entre ces souches et celles non-aflatoxinogènes appartenant aux mêmes espèces.

Par conséquent, nous avons examiné si la PCR-RFLP utilisée dans notre étude pourrait les différencier, cependant, aucune différence dans les longueurs de fragments de restriction entre les cultures aflatoxinogènes et non-aflatoxinogènes a été observée. Toutefois, une PCR multiplex en utilisant des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'AFB1 (*nor1*, *ver1*, *aflR* et *omt1*) est en cours de réalisation. Cette étude doit compléter la PCR-RFLP dont le but serait de pouvoir différencier entre les souches aflatoxinogènes et non aflatoxinogènes.

Conclusion générale et Perspectives

La présence de l'ochratoxine A dans la filière raisin constitue un problème sanitaire et économique de part le monde là où la culture de la vigne est répandue et où la consommation du raisin et de ses dérivés est de coutume. Instaurer une législation garantissant la qualité sanitaire au sein de la filière, nécessite des données précises sur les points critiques de maîtrise tout au long de la vie d'un produit, depuis sa culture jusqu'à sa transformation et son stockage. La détection rapide et précise des champignons mycotoxinogènes ainsi que la mise en place d'une stratégie de décontamination constituent également une deuxième étape très importante pour la lutte contre la mycotoxine.

Au cours de notre étude, menée sur les vins et les vignobles libanais, le premier objectif identifié fut l'étude de l'état des lieux des vins finis libanais vis-à-vis de l'ochratoxine A, la célèbre mycotoxine des vins méditerranéens.

Pour répondre à cet objectif, plusieurs échantillons de vins rouges et blancs (1996-2003) ont été analysés.

Les résultats obtenus ont montré que 60% des vins rouges analysés ainsi que 15% des vins blancs ont été faiblement contaminés par l'OTA. La différence des pourcentages de contamination entre vins rouges et blancs a été rapportée aux différences dans les procédés technologiques de fermentation en rouge et en blanc. Toutefois, les niveaux de contamination obtenus étaient bien en dessous de la norme internationale fixée à 2µg/L. Etant bien en dessous de la NIF, le problème de contamination des vins libanais par l'OTA semble loin d'être critique, Toutefois, une surveillance continue du taux de cette mycotoxine dans les vins en fonction du millésime devrait être établie.

Vu les résultats obtenus, une étape préliminaire s'avérait nécessaire. Il s'agissait de l'étude de la microflore fongique contaminant les vignobles et responsable de la production de l'OTA mais aussi d'autres mycotoxines, contaminant ainsi les moûts et les produits dérivés, ce qui constituait le deuxième, le troisième et le quatrième objectifs de notre travail.

Les remarques soulevées suite à cette étude ont montré que les vignobles libanais sont touchés par des champignons filamenteux des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. De ces deux genres, deux espèces productrices de mycotoxines furent identifiées. Il s'agissait de *A. carbonarius* du groupe *Aspergillus* de la section *Nigri*, la seule espèce 100% ochratoxinogène, et responsable de la contamination des moûts par l'OTA. L'autre espèce fut

A. flavus du groupe *Aspergillus flavi*, la seule espèce productrice d'AFB1 avec un pourcentage aflatoxinogène de 43%, et responsable de la contamination des moûts par l'AFB1. Le stade de maturation serait le moment critique de la contamination, où l'occurrence maximale des champignons ainsi que les valeurs maximales des mycotoxines ont été détectées.

Toutefois, la complexité du modèle vignoble, fait que la contamination pourrait différer d'un département à l'autre, d'une variété à l'autre et d'une année à l'autre. La présence d'autres facteurs d'origine naturelle tels que les facteurs climatiques, édaphiques, géologiques et écologiques ou ceux d'origine anthropogénique liés aux pratiques culturales et leurs interactions pourraient intervenir dans le processus de la toxino-génèse et rendre diversifiées et impossible à préciser les causes de la contamination.

Les résultats obtenus concernant l'occurrence de la microflore fongique totale et mycotoxinogène n'ont pas montré des différences significatives durant chaque année entre les régions concernées par l'étude. Cette réalité a été expliquée par le fait que ces différentes régions appartiennent à une même situation géographique et climatique de même que les vignobles concernés appartiennent tous à une même firme donc ils sont soumis presque aux mêmes pratiques culturales (irrigation, pesticides utilisés, vendange manuelle, mode de conduite, etc...) ce qui a comme effet de réduire l'influence de la variabilité des facteurs mis en œuvre dans chaque vignoble. Cependant, la différence dans l'occurrence des champignons entre les deux années d'étude a été rapportée à la seule variable climatique qui est l'humidité relative où, une variation de 20% de ce facteur a été enregistrée entre les deux années pendant la maturation des raisins.

Cette différence fait que la notion de millésime est d'une grande importance et que des différences significatives peuvent apparaître d'une année à l'autre avec un changement radical des résultats. Une suite de cette étude sur plusieurs années serait d'une importance majeure en prenant en considération le maximum de facteurs qui peuvent rentrer en jeu. Ce qui nous permet d'établir un système modèle qui nous aidera à prévenir les données sur la niche écologique de la vigne et les différents microorganismes mycotoxinogènes qu'elle peut abriter.

Le suivi des taux d'OTA et d'AFB1 en fonction des étapes de fermentation nous a permis d'observer un profil décroissant de ces taux en allant de la fermentation alcoolique jusqu'à l'élevage des vins. Ceci a été rapporté à un phénomène d'adsorption de ces deux mycotoxines sur les parois levuriennes. Ainsi, comme perspective, ce pouvoir des microorganismes naturels de fermentation constitue une piste intéressante à développer et à prendre en considération pour la décontamination des vins contenant des mycotoxines.

Les facteurs significatifs agissant sur le développement et la toxigénèse des champignons furent l'activité de l'eau (A_w), la température ainsi que leur interaction. L'expérience menée sur la croissance et la toxigénèse des souches aflatoxinogènes en fonction de ces facteurs sur un milieu modèle, nous a permis de montrer que les facteurs température, A_w , ainsi que leur interaction ($T^{\circ}C-A_w$) sont des facteurs déterminant dans la croissance des champignons mais aussi les facteurs les plus critiques influençant leur pouvoir toxigènes. De loin, il se voit de même qu'indépendamment de la température, le facteur A_w intervient profondément dans la détermination des seuils de croissance ainsi que de la toxigénèse des souches et que, cette intervention a un impact plus décisif que celui de la température. Toutefois, l'interaction A_w -Température est le facteur prépondérant à prendre en considération, or la croissance et la toxigénèse des champignons nécessitent l'intervention de ces deux facteurs qui agissent en synergie pour définir les seuils.

Cette étape préliminaire nous a donné une idée sur le comportement de ces champignons vis-à-vis de ces facteurs, cependant, la complexité des facteurs agissant au vignoble requiert des tests supplémentaires vis-à-vis d'autres facteurs afin de mieux comprendre et prévoir la réaction des champignons dans le milieu naturel.

Enfin, le dernier objectif de notre travail a porté sur la caractérisation moléculaire des espèces *A. flavus* et *A. parasiticus* de la section *flavi*, majeures productrices d'aflatoxine. Ceci avait pour but de développer une nouvelle technique précise pour l'identification de ces deux espèces réduisant ainsi le temps et le coût d'analyse.

Dans cette étude basée sur la PCR-RFLP, les deux espèces *A. flavus* et *A. parasiticus* ont pu être différenciées. Le modèle de PCR-RFLP obtenu avec Bgl II a pu donc montrer des

variabilités génétiques existantes et suffisantes pour les distinguer entre elles. Cette technique s'avère plus simple, plus rapide et moins coûteuse que les techniques conventionnelles de séquençage des produits PCR suivies par des comparaisons au niveau des séquences pour détecter les variations génétiques.

Toutefois, La présente étude n'a pas permis de comparer entre les souches aflatoxinogènes et non aflatoxinogènes de ces deux espèces. En effet, aucune différence dans les longueurs de fragments de restriction entre les cultures aflatoxinogènes et non-aflatoxinogènes n'a été observée. Par conséquent, une perspective portant sur une PCR multiplex utilisant des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'AFB1 (*nor1*, *ver1*, *aflR* et *omt1*) reste à développer. Cette multiplex doit compléter la PCR-RFLP dans le but de pouvoir différencier entre les souches productrices ou non d'aflatoxine.

Références Bibliographiques

Abarca, L. M., Accensi, F., Cano, J., Cabanes, J. F. 2004. Taxonomy of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*. 86, 33-49.

Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castella, G., Cabanes, F. J. 1994. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60, 2650-2652.

Aboul-Enein, H.Y., Kutluk, O.B., Altiokka, G., Tunçel, M. 2002. A modified HPLC method for the determination of ochratoxin A by fluorescence detection. *Biomedical Chromatography*. 16, 470-474.

Abramson, D. 1987. Measurement of ochratoxin A in barely extracts by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 391, 315-320.

Adebajo, L.O ., Bamgbelu, O.A., Olowu, R.A. 1994. Mould contamination and the influence of water activity and temperature on mycotoxin production by two aspergilli in melon seed. *Die Nahrung*. 38, 209-217.

Allcroft, R. and Carnaghan, R.B.A. 1963. An examination for toxin in human food products from animals fed toxic groundnut meal. *Veterinary Record*. 75, 259.

Al-Musallam, A. 1980. Revision of the black *Aspergillus* species. PhD. Thesis. University of Utrecht, the Netherlands.

Andersen, B., Thrane, U. 1996. Secondary metabolites produced by *Alternaria*

Anonymous. 1999. Report of the CDC Working Group on Pulmonary Hemorrhage/Hemosiderosis. Published online at http://www.cdc.gov/od/ads/pulhem_inf.htm.

Arora, R.G., Frolen, H., Nilsson, A. 1981. Interference of mycotoxins with prenatal development of the mouse. *Acta Vet. Scand.* 22, 638-641.

Asao, T., Büchi, G., Abdel-kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L., Wogan, G.N. 1963. Aflatoxins B and G. *Journal of American Chemical Society.* 85, 1706.

Asao, T., Büchi, G., Abdel-kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L., Wogan, G.N. 1965. Structures of aflatoxins B and G₁. *Journal of American Chemical Society.* 87, 822-826.

Ayerst, G. 1969. The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi, *Journal of Stored Products Res.* 5, 127-141.

Bauer, J., and M. Gareis, 1987. Ochratoxin A im der Nahrungsmittelkette. *J. Vet. Med. Ser. B.* 34, 613.

Belli, N., Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A.J (2004). Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus section Nigri* obtained from grapes. *International Journal of Food Microbiology.*

Bilgrami, K.S. and Sinha, K.K. 1992. Aflatoxins: their biological effects and ecological significance. *Handbook of Applied Mycology.* 5, 5-86.

Blesa, J., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. 2004. Concentration of ochratoxin A in wines from supermarkets and stores of Valencian Community (Spain). *Journal of Chromatography A.* 1054, 397-401.

Blesa, J., Soriano, J.M., Molto, J.C., Manes, J. 2004. Concentration of Ochratoxin A in wines from supermarkets and stores of valencian Community (Spain). *Journal of Chromatography A*.

Bouchet, P., Guignard, J.L., Madulo-Leblond, G., Régli, P. *Mycologie générale et médicale*. Ed. Masson (Paris), 1989. Chap.4,36.

Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, P.H., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y., Veau, P. *Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle*, 2^e Ed. Masson (Paris), 1990. P :442.

Boudra, H., Le Bars, P., Le Bars, J. 1995. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 1156-1158.

Boutibonnes, P. and Jacquet, J. 1971. Effet biologiques des flavocoumarines d'*Aspergillus parasiticus* ATCC 15517 *Revue d'immunologie* (Paris). 35, 103-120.

Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Cabanes, F.J. 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*. 71, 139– 144.

Bredenkamp, M.W., Dillen, J.L.M., van Rooyen, P.H., Steyn, P.S. 1989. Crystal Structures and conformational analysis of ochratoxin A and B: probing the chemical structure causing toxicity. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions*. 2, 1835-1839.

Budavari, S., Ed. 1989. *The Merck Index*, 11th ed., Rahway, NJ, Merck & Co., pp. 30-31.

Burdaspal, P.A., Legarda, T.M. 1999. Ochratoxin A in wines and grape musts and juices produced in Spain and other European countries. *Alimentaria (Madrid)*, 299, 107-113.

Cabanes, F.J., Accensi, F., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castella, G., Minguez, S., Pons, A. 2002. What is the source of ochratoxin A in wine?. *International Journal of Food Microbiology*. 79, 213-215

CAST. 1989. Mycotoxins: economic and health risks, p. 1-91. Task Force Report No. 116. Ames, Iowa, United States, Council for Agricultural Science and Technology.

Castegnaro, M., Barek, J., Frémy, J.M., Lafontaine, M., Miraglia, M., Sansone, E.B., Telling, G.M. 1991. Laboratory Decontamination and Destruction of Carcinogens in Laboratory Wastes: some Mycotoxins. IARC Scientific Publications N: 113, Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp.63.

Castellari, M., Fabbr, S., Fabiani, A., Amati, A., Galassi, S. 2000. Comparison of different immunoaffinity clean-up procedures for high-performance liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in wines. *Journal of Chromatography A*. 888, 129-136.

Chan, D.; MacDonald, S.J.; Boughtflower, V.; Brereton, P. 2004. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean up liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 1, 2, 13-16.

Chu, F.S. 1977. Mode of action of mycotoxins and related compounds. *Adv. Applied Microbiology.*, 22, 83-89.

Cole, R.J., Cox, R.H. 1981. *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*, (New York), Academic Press. 1-66

Creppy, E.E., Betbeder, A.M., Gharbi, A., Counord, J., Castegnaro, M., Bartsch, H., Moncharmont, P., Fouillet, B., Chambon, P., Dirheimer, G. 1991. Human ochratoxicosis in France. In : Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky I.N. & Bartsch H., eds, Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours, IARC Scientific Publ. No 115, Lyon. 145-151.

D'Mello, J. P. F., MacDonald, A. M. C. 1997. Mycotoxins. Animal Feed Science Technology. 69, 155-166.

Da Rocha Rosa, C.A., Palacios,V., Combina, M ., Fraga, M.E., De Oliveira Rekson, A ., Magnoli,C.E., Dalcerro, A.M. 2002. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. Food and Additives Contaminants. 19, 408-414.

Dashek, W.V and Llewellyn, G.C. 1983. Mode of action of the hepatocarcinogens, aflatoxins in plant systmes : a review. Mycopathology. 81, 83-92.

Delage, N., d'Harlingue, A ., Colonna, B., Ceccaldi ., Bompeix, G. 2003. Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wines. Food control. 14, 225-227.

Derache, R. 1986. Toxicologie et sécurité des aliments. Technique et documentation – Lavoisier, Aparia, (Paris), 105-126, 299-321

DiPaolo, J.A., Elis, J., Erwin, H. 1967. Teratogenic response by hamsters, rats and mice to aflatoxin B₁. Nature. 215, 638-640.

Directorate-D- Fodd Safety: Protection and Distribution Chain D3- Chemical and Physical Risks; Surveillance. 3rdOTA Forum January 2003 (Brussels).

Dirheimer, G., E. E. Creppy. 1991. Mechanism of action of ochratoxin A. Pages 171–186 in: *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*. M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I. N. Chernozemsky, and H. Bartsch, eds. Publ. No. 115, International Agency for Research on Cancer, (Lyon), France.

Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.-H. 1980. "Compendium of Soil Fungi". (London): Academic Press

Drouillard, J.B ., Sage, L ., Pladeau, V., Kalankin, D. 2003. Ochratoxine A dans les vins : un partenariat filière pour des solutions pratiques au vignoble. *Revue Française d'œnologie- SEP/OCT 2003 N :202*.

Edel, V. 1998. Polymerase chain reaction in mycology: an overview. In: Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A., Elander, R.P. *Applications of PCR in mycology*. CABInternational. UK.

Edwards, S.G., Pirgozliev, S.R., Hare, M.C., Jenkinson, P. 2001. Quantification of trichothecene-producing *Fusarium* species in harvested grain by competitive PCR to determine efficacies of fungicides against *Fusarium* head blight of winter wheat. *Applied Environmental Microbiology*. 67, 1575–1580

El Adlouni, C., Tozlovanu, M., Naman, F., Faid, M., Pfohl-Leszkowicz, A., 2006. Preliminary data on the presence of mycotoxins (Ochratoxin A, citrinin and aflatoxin B1) in black table olives" Greek style" of Moroccan origin. *Molecular Nutrition and Food Reseach*. 50, 507-512.

Elling, F., Nelsen, J. P., Lillehoj, E. B., Thomassen, M. S., Stormer, F. C. 1985. Ochratoxin A - induced porcine nephropathy: enzyme and ultrastructural changes after short-term exposure. *Toxicon*. 23, 247-254.

Eskola, M. 2002. Study on trichothecenes, Zearalenone and Ochratoxin A in Finnish Cereals : Occurrence and Analytical Techniques. Academic dissertation.

Esteban, A., Abarca, M. L., Bragulat, M. R. Cabanes, F. J. 2004. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. *Research in Microbiology*. 155, 861-866.

European Commission: Health & Consumer Protection Directorate-General.

Frisvad, J.C., Bridge, P.D., Arora, D.K. 1998. *Chemical fungal taxonomy*. (New York): Marcel Dekker.

Filali, A., Ouammi, L., Betbeder, A.M., Baudrimont, I., Soulaymani, R., Benayada, A., Creppy, E.E. 2001. Ochratoxin A in beverages from Morocco : a preliminary survey. *Food and Additives Contaminant*. 18, 565-568.

Gabal, M.A., Hegazi, S.A., Hassanin, N. 1994. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* field isolates. *Veterinary and Human Toxicology*. 36, 519-521.

Garner, R.C., Martin, C.N., Smith, J.R.L., Coles, B.F., Tolson, M.R. 1979. Comparison of aflatoxin B₁ and aflatoxin G₁ binding to cellular macromolecules in vitro, in vivo and after peracid oxidation; characterisation of the major nucleic acid adducts. *Chem.-biol. Interactions*. 26, 57-73.

Gautier, J.C., Holzhaeuser, D., Markovic, J., Gremaud, E., Schilter, B., Turesky, R.J. 2001. Oxidative damage and stress response from ochratoxin A exposure in rats. *Free Radic Biol Med*. 30, 1089-1098.

Geisen, R. 1996. A multiplex PCR reaction for the detection of aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *Systematic and Applied Microbiology*. 19, 388-392.

Geisen, R., Mayer, Z., Karolewicz, A., Farber, P. 2004. Development of a Real Time PCR System for detection of *Penicillium nordicum* and for Monitoring Ochratoxin A production in foods by targeting the ochratoxin polyketide synthase gene. *System. Appl. Microbiol.* 27, 501-504.

González-Jaén, M.T., Mirete, S., Patino, B., López-Errasquín, E., Vázquez, C. 2004. Genetic markers for the analysis of variability and for production of specific diagnostic sequences in fumonisin-producing strains of *Fusarium verticillioides*. *European Journal of Plant Pathology.* 110, 525–532.

Grice, M.C., Moddie, C.A., Smith, D.C. 1973. The carcinogenic potential of aflatoxin or its metabolites in rats from dam fed aflatoxin pre- and post-partum. *Cancer Research.* 33, 262-266.

Groopman, J.D., Croy, R.G., Wogan, G.N. 1981. In vitro reactions of aflatoxin B₁-adducted DNA. *Proc. natl Acad. Sci. USA.* 78, 5445-5449.

Guarro, J., Gené, J., Stchigel, A.M. 1999. Developments in fungal taxonomy. *Clinical and Microbiological Review.* 12 (3), 454–500.

Hamari, Z., Kevei, F., Kovacs, E., Varga, J., Kozakiewicz, Z., Croft, J. H. 1997. Molecular and phenotypic characterisation of *Aspergillus japonicus* strains with special regard to their mitochondrial DNA polymorphisms. *Antonie van Leeuwenhoek.* 72, 337-347.

Hassen, W., Abid-Essafi, S., Achour, A., Guezzah, N., Zakhama, A., Ellouz, F., Creppy, E.E., Bacha, H. 2004. Karyomegaly of tubular kidney cells in human chronic interstitial nephropathy in Tunisia: respective role of Ochratoxin A and possible genetic predisposition. *Hum Exp Toxicol.* 23(7), 339–346

Heathcote, J.G and Hibbert, vJ.R. 1978. *Aflatoxins : chemical and biological aspects*, Elsevier, Amsterdam. 212-222.

Heenan, C.N., Shaw, K.J., Pitt, J.I. 1998. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *Journal of Food Mycology*. 1, 67-72.

Henning, A., Fink-Gremmels, J., Leistner, L. 1991. Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation. In *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours* (M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I. N. Chernozemsky, and H. Bartsch, Eds.). IARC Scientific Publications, Vol. 115, 255–260. International Agency for Research on Cancer, (Lyon).

Henry, T., Iwen, P.C., Hinrichs, S.H. 2000. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology*. 38, 510–515.

Henson, J., French, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31, 81–109.

Hohler, D. 1998. Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action. *Z. Ernahrungswiss.* 37, 2–12.

Horie, Y. 1995. Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. *Nippon Kingakukai Kaiho.* 36, 73-76.

Huff, W.E., Kubena, L.R., Harvey, R.B. 1992. Progression of ochratoxicosis in broiler chickens. *Poultry Science.* 71, 64-69.

IARC (International Agency for Research on Cancer) .1993. IARC Monograph on evaluation of carcinogenic risks to humans : some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Vol. 56,489-521 (Lyon : IARC).

IARC, 1976. Cancer incidence in Five Continents, Volume III, edited by J. Waterhouse, P. Correa, C. Muir and J. Powel, Lyon. in task 3.2.7. infectoria and their use as chemotaxonomic markers. Mycotoxin Research. 12, 54–60.

Jakab, G.J., Hmielski, R.R., Zarba, A., Hemenway, D.R., Groopman, J.D. 1994. Respiratory aflatoxicosis : suppression of pulmonary and systemic host defenses in rats and mice. Toxicology and Applied Pharmacology. 125, 198-205.

Kano, ROK., Nakamura, Y., Ooka, S., Kashima, M., Mizoguchi, M., Watanabe, S., Hasegawa, A. 2000. Differences among chitine synthase I gene sequences in *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. Med. Mycol. 38, 47–50.

Kevei, F., Hamari, Z., Varga, J., Kozakiewicz, Z., Croft, J. H. 1996. Molecular polymorphism and phenotypic variation in *Aspergillus carbonarius*. Antonie van Leeuwenhoek. 70, 59-66.

Klich, M. A., Pitt, J. I. 1988. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their telomorphs. CSIRO Division of Food Processing, North Ryde, Australia. Kozakiewicz, Z. (1989) *Aspergillus* species on stored products. Mycol. 161, 1–188.

Kumagai, S., Bintvihok, A., Kono, M., Iwaki, M., Sugita-Konishi, Y., Ito, Y., Kato, M. 1995. In vitro aflatoxin B₁-DNA binding by microsomes and its modulation by cytosol : comparison of various mammalian and avian livers in relation to species differences in susceptibility. J. Food Hyg. Soc. Japan. 36, 365-374.

Kusters-van Someren, M. A., Samson, R. A., Visser, J. 1991. The use of RFLP analysis in classification of the black *Aspergilli*: reinterpretation of *Aspergillus niger* aggregate. Current Genetics. 19, 21-26.

Kutrzman, C.P., Horn, B.W., Hesseltine, C.W. 1987. *Aspergillus nominus*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 53, 147-158.

Lanfranco, L., Wyss, P., Marzach, C., Bonfante, P. 1995. Generation of RAPD-PCR primers for the *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Ecology*. 4, 61 -68.

Lea, T., Steien. K., Stormer. C. 1989. Mechanism od ochratoxin A induced immunosupresion. *Mycopathologia*. 107, 153-159.

Le Bars, J., Le Bars, P. 1987. Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. Conférences prononcées dans le cadre de la réunion de la "Section Midi-Pyrénées" à Toulouse, le 18 septembre 1987, (cf. Bulletin de l'Association des Anciens élèves de l' Institut Pasteur, 4e trimestre 1987).

Lee, T., Yun, S.H., Hodge, K.T., Humber, R.A., Krasnoff, S.B., Turgeon, G.B., Yoder, O.C., Gibson, D.M. 2001. Polyketide synthase genes in insect-and nematodeassociated fungi. *Applied in Microbiology and Biotechnology* 56, 181-187.

Lopez de Cerain, A., Gonzalez-Penas,E ., Jimenez, A.M., Bello, J. 2002. Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. *Food and Additives Contaminants*. 19, 1058-1064.

Lübeck, M.P.S.K., Lübeck, P.S., Jensen, D., Thrane, U. 2000. Identification of *Trichoderma* strains from building materials by ITS1 ribotyping, UP-PCR fingerprinting and UP-PCR cross hybridization. *FEMS Microbiol.Lett.* 129-134.

Lund, F and Frisvad, J.C. 2003. *Penicillium verrucosum* in cereals indicates production of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology*. 95, 1117-1123.

Madhavan, T.V., Suryanarayana, K., Tulpule, P.G. 1965. Effect of dietary protein level on susceptibility of monkeys to aflatoxin liver injury. *Indian J. Med. Res.* 53, 985-990

Makimura, K. T. Y., Murakami, A., Kano, R., Nakamura, Y., Hasegawa, A., Uchida, K., Yamaguchi, H. 2001. Cluster analysis of human and animal pathogenic *Microsporum* species and their teleomorphic states, *Arthroderma* species, based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer I. *Microbiol. Immunol.* 45 (3), 209–216.

Manolova, Y., Manolov, G., Parvanova, L., Petkova-Bocharova, T., Castegnaro, M., Chernozemsky, I.N. 1990. Induction of characteristic chromosomal aberrations, particularly x-trisomy, in cultured human lymphocytes treated by ochratoxin A; a mycotoxin implicated in Balkan endemic nephropathy. *Mutat. Res.*,

Markaki, P., Delpont, C., Binet., Grosso, F., Dragacci, S. 2001. Determination of ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Protection.* 64, 533-537.

Martinez-Culebras, P.V., Ramon, D. 2006. An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology.*

Medina, A., Mateo, R., Lopez-Ocana, L., Valle-Algarra, F.M., Jimenez, M. 2005. Study of Spanish Grape Mycobiota and ochratoxin A Production by Isolates of *Aspergillus tubingensis* and Other Members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology.* 71, 4696-4702.

Mégnégneau, B., Debets, F., Hoekstra, R.F. 1993. Genetic variability and relatedness in the complex group of black aspergilla based on random amplification of polymorphic DNA. *Current genetics.* 23, 232-329.

Melki Ben Fredj, S., Chebil, S., Lebrihi, A., Ghorbel, A., Mliki, A. 2006. Occurrence of pathogenic fungal species in Tunisian vineyards. *International Journal of Food Microbiology*.

Michelmore, W and Hulbert, S. H. 1987. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25, 383-404.

Miller, J.D., Trenholm, H.L. 1994. Mycotoxins In Grain/ Compounds Other Than Aflatoxin. 5, 261-263.

Miraglia, M and Brera, C. 2002. Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States. Reports of experts participating

Mirete, S. 2003. Analisis y diagnostico molecular de *F. verticillioides* y otras especies del complejo *Gibberella fujikuroi* productoras de fumonisinas. PhD Thesis, University Complutense of Madrid, Spain.

Mirete, S., Patin˜o, B., Vazquez, C., Jimenez, M., Hinojo, M.J., Soldevilla, C., Gonzalez-Jaen, M.T. 2004. Fumonisin production by *Gibberella fujikuroi* strains from *Pinus* species. *International Journal of Food Microbiology*. 89, 213–221.

Moeller, E.M., Chelkowski, J., Geiger, H.H. 1999. Species-specific PCR assays for the fungal pathogens *Fusarium moniliforme* and *Fusarium subglutinans* and their application to diagnose maize ear rot. *Journal of Phytopathology*. 147, 497–508.

Molinié, A., Faucet, V., Castegnaro, M., Pfohl-Leszkowicz, A. 2005. Analysis of some breakfast cereals collected on the French market for their content in OTA, Citrinin and Fumonisin B1. Development of a new method for simultaneous extraction of OTA and Citrinin. *Food chemistry*. 92, 391-400.

More, J., Galtier, P., Alvinerie, M. 1978. Toxicite de l'ochratoxine A. III. Effets pendant les stades initiaux de la gestation chez le rat. *Ann. Rech. vet.* 9(1), 169-173

Moss, M.O. 1996. Mode of formation of ochratoxin A. *Food and Additives. Contaminants.* 13 (suppl), 5-9.

Mullis, K.B., Faloona, F.A., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G.T., Erlich, H.A. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51, 263-273.

Newberne, P.M and Butler, W.H. 1969. Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals. A review. *Cancer Research.* 29, 29-33.

Niessen, L., Vogel, R.F. 1998. Group specific PCR-detection of potential trichothecene - producing *Fusarium* species in pure cultures and cereal samples. *Systematic and Applied Microbiology.* 21, 618-631

O'Callaghan, J., Caddick, M.X., Dobson, A.D.W. 2003. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology.* 149, 3485-3491.

Olsson, J., Börjesson, T., Lundstedt, T., Schnürer, J. 2002. Detection and quantification of ochratoxin A and deoxynivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose. *International Journal of Food Microbiology.* 72, 203-214

Olutiola, P.O. 1976. Cellulase enzymes in culture filtrates of *Aspergillus flavus*. *Trans Br Mycol Soc.* 67, 265-268.

Ong, T. 1975. Mutagenicity of mycotoxins. *Mutat. Res.* 32, 35-39.

Ono, H., Kataoka, A., Koakutsu, M., Tanaka, K., Kawasugi, S., Wakazawa, M., Ueno, Y., Manabe, M. 1995. Ochratoxin A productibility by strains of *Aspergillus niger* group stored in IFO culture collection. *Mycotoxins*. 41, 47-51.

Ospital, M., Cazabeil, J.M., Betbede, A.M., Tricard, C., Creppy, E., Medina, B. 1998. L'Ochratoxine A dans les vins. *Oenologie*. 169, 16-19.

Otteneder, H., Majerus, P. 2000. Occurrence of ochratoxin A in wines : influence of the type of wine and its geographical origin. *Food and Additives Contaminants*. 17, 793-798.

Paranecova, L., Benen, J. A. E., Samson, R. A., Visser, J. 1997. evaluation of RFLP analysis of the classification of selected black aspergilli. *Mycology Research*. 101, 7, 810-814.

Paranecova, L., Skouboe, P., Frisvad, J., Samson, R. A., Rossen, L., Ten Hoor-Suykerbuyk, M., Visser, J. 2001. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 521-527.

Paranicova, L., Skouboe, P., Frisvad, J., Samson, R., Rossen, L., Hoor-Suykerbyuk, M.T., Visser, J., 2001. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 521- 527.

Patino, B., Gonzalez-Salgado, A., Gonzalez-Jaen, M.T., Vazquez, C. 2005. PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. *International Journal of Food Microbiology*. 104, 207- 214.

Patterson, D.SP and Allcroft, R. 1970. Metabolism of aflatoxin in susceptible and resistant animal species. *Food Cosmet. Toxicol*. 8, 43-53.

Pedersen, L., Skouboe, P., Boysen, M., Souleb, J., Rossen, L. 1997. Detection of *Penicillium* species in complex food samples using the polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology*. 35, 169- 177.

Pelegri-nelli-Fungaro, M.H., Vissoto, P.C., Sartori, D., Vioas-Boas, L.A., Furlaneto, M.C., Taniwaki, M.H. 2004. A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. *Current Microbiology*. 49, 123–127.

Petzinger, E and Weidenbach, A. 2002. Mycotoxins in the food chain: the role of Ochratoxins. *Livestock Production Science*. 76, 245-250.

Pfohl-Leszkowicz, A et Castegnaro, M. 1999. L'Ochratoxine A dans: *Mycotoxines: Evaluation et gestion du risqué*, chapitre 9, Lavoisier, Tec & Doc, (Paris). 249-278.

Pier, A.C., Richard, J.L., Cysewski, S.J. 1980. The implications of mycotoxins in animal disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176, 719-725.

Pier, A.C., Varman, M.J., Dahlgren, R.R., Belden, E.L., Maki, L.R. 1986. Aflatoxic suppression of cell-mediated immune response and interactions with T-2 toxin in : Steyn, P.S. and Vleggar, R., eds. *Mycotoxins and Phycotoxins*. Elsevier, (Amsterdam). 423-427.

Pitt, J. I. 1987. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology*. 53, 266–269.

Pitt, J. I., Hocking, A. D. 1997. *Fungi and Food spoilage*, 2nd edn. Blackie Academic and Professional, London.

Pryor, B.M., Davis, M., Gilbertson, R.L. 1994. Detection of *Alternaria radicina* and *A. dauci* using a PCR-based assay. *Phytopathology*. 84, 1087.

Puisieux, A., Lim, S., Groopman, J., Ozturk, M. 1991. Selective targeting of p53 gene mutational hotspots in human cancers by etiologically defined carcinogens. *Cancer Research*. 51, 6185-6189.

Puntaric, D. 2001. Ochratoxin A in corn and wheat: geographical association with endemic nephropathy. *Croat Med J*. 42,175.

Rao, K.S., Gehring, P.J. 1971. Acute toxicity of aflatoxin B1 in monkeys. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 19, 169-173.

Raper, K. B., Fennel, D. I. 1965. *The genus Aspergillus*. William and Wilkins (New York), USA.

Ratulo, N., Martins, L., Alves, A. 2004. Ochratoxin A in wines-assessing global uncertainly associated with the results. *Analytica Chimica Acta*. 513, 319-324.

Ribelin, W. E., Fukushima, K., Still, P.E. 1978. The toxicity of ochratoxin A to ruminants. *Can. J. Comp. Med*. 42, 172-176.

Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, C., Erlich, H., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of β - globin genomic sequences and restriction site analyses of sickle cell anemia. *Science*. 230, 1350 - 1354.

Samson, R.A. 1992. Current taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and its teleomorphs. In: Bennett JW, Klich MA (eds). *Aspergillus Biology and Industrial Applications*. Boston MA: Butterworth-Heinemann, 329-353.

Samson, R. A., Houbraeken, J. Q. M. P., Kuijpers, A. F. A., Frank, J. M., Frisvad, J. C. 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*. 50, 45-61.

Schilling, A.G., Möller, E.M., Geiger, H.H. 1996. Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F.avenaceum*. *Phytopathology*. 86, 515-522.

Schmidt, H., Taniwaki, M.H., Vogel, R.F., Niessen, L. 2004. Utilization of AFLP markers for PCR-based identification of *Aspergillus carbonarius* and indication of its presence in green coffee samples. *Journal of Applied Microbiology*. 97, 899-909.

Schnerr, H., Niessen, L., Vogel R. F. 2001. Real time detection of the *tri5* gene in *Fusarium* species by Lightcycler-PCR using SYBR Green I for continuous fluorescence monitoring. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 53-61.

Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C. & Van Dijck, P. W.2002. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59, 426-435

Scudamore, K.A and Livesey, C.T. 1998. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *J. Sci. Food Agric*. 77, 1-17.

Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z. and Venâncio, A. 2003. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*. 88, 63-68.

Shapira, R., Paster, N., Eyal, O., Menasherov, M., Mett, A., Salomon, R. 1996. Detection of aflatoxinogenic molds in grains by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 3270-3273.

Shephard, G.S., Fabiani, A., Stockenstrom, S., Mshicileli, N., Sewram, V. 2003. Quantitation of ochratoxin A in south African wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51, 1102-1106.

Soleas, G.J., Yan, J., Goldberg, D.M. 2001. Assay of Ochratoxin A in Wine and Beer by High-Pressure Liquid Chromatography Photodiode Array and Gas Chromatography Mass Selective Detection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 49, 2733-2740.

Stefanaki, I., Foufa, E., Tsatsou-Dritsa, A., Dais, P. 2003. Ochratoxin A concentrations in Greek domestic wines and dried vine fruits. *Food Additives and Contaminants*. 20 (1), 74-83.

Stevens, A.J., Saunders, C.N., Spence, J.B., Newham, A.G. 1960. Investigations into "disease" of turkey poults. *Vet. Rec.* 72, 627-628.

Steyn, P. S., 1984. Ochratoxin and related dihydroisocoumarins. Pages 183–216 in: *Mycotoxin-Production, Isolation, Separation and Purification*. V. Betina, ed. Elsevier, (Amsterdam), The Netherlands.

Svoboda, D., Grady, H.J., Higginson, J. 1966. Aflatoxin B₁ injury in rat and monkey liver. *Am. J. Med.* 46, 1023-1028.

Sweeney, M. J., Dobson, A. D. W. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology*. 43, 141–158.

Terao, K., Ueno, Y. 1978. Morphological and functional damage to cells and tissues in : Uraguchi, K and Yamazaki, M., eds. *Toxicology. Biochemistry and Pathology of mycotoxins*. John Wiley & Sons, (New York), 189-197.

Thom, C., Church, M.B. 1926. *The Aspergilli*. Williams & Wilkins Co, Baltimore.

Trivedi, A.B., Doi, E., Kitabatake, N. 1992. Detoxification of Ochratoxin A on Heating under Acidic and Alkaline Conditions. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56 (5), 741-745.

Tulpule, P.G., Madhavan, T.V., Gopalan, C. 1964. Effect of feeding aflatoxin in young monkeys. *Lancet*, i, 962-964.

Tulpule, P.G. 1981. Aflatoxins-experimental studies. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.* 99, 137-140.

Van der Merve, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L., Scott, D.B., Theron, J.J. 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. *Wilh. Nture.* 205, 1112-1113.

Varga, J., Juhasz, A., Kevei, F., Kozakiewicz, Z. 2004. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. *European Journal of Plant Pathology.* 110,627- 640.

Varga, J., Kevei, E., Hamari, Z., Toth, B., Teren. J., Croft, H., Kozakiewicz, Z. 2000. Genotypic and phenotypic variability among black *Aspergilli*. In: Samson, R. A., Pitt, J. I.(eds), *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification.* Harwood Academic Publishers. (Amsterdam), The Netherlands, pp. 397-411.

Varga, J., Kevei, E., Rinyu, E., Teren, J., Kozakiewicz, Z. 1996. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environmental Microbiology.* 62, 4461-4464.

Varga, J., Kevei, F., Fekete, C., Coenen, A., Kozakiewicz, Z., Croft, J.H. 1993. Restriction fragment length polymorphisms in the mitochondrial DNAs of the *Aspergillus niger* aggregate. *Mycological Research*. 97, 1207-1212.

Varga, J., Rigo, K., Toth, B., Teren, J., Kozakiewicz, Z. 2003. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically Important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology*. 41, 29-36.

Visconti, A., Pascale, M., Centoze, G. 1999. Determination of ocratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 864, 89-101.

Visser, E.J.W., Blom, C.W.P.M., Voeselek, L.A.C.J. 1996a. Flooding induced adventitious root formation in *Rumex*: morphology and development in an ecological perspective. *Acta Bot Neerl*. 45,17-28

Visser, E.J.W., Bogemann, G.M., Blom, C.W.P.M., Voeselek, L.A.C.J. 1996b. Ethylene accumulation in waterlogged *Rumex* plants: a prerequisite for adventitious root formation. *J. Exp. Bot*. 47, 403-410

Wicklow, D.T., Dowd, P.F., Alfatafta, A.A., and Gloer, J.B. 1996. Ochratoxin A: an antinsectan metabolite from the sclerotia of *Aspergillus carbonarius* NRRL 369. *Canadian Journal of Microbiology*. 42,1100-1103.

Wicklow, D.T., Shotwell, O.L. 1983. Intrafungal distribution of aflatoxin among conidia and sclerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Canadian Journal of Microbiology*. 29, 1-5.

Wiglesworth, M.D., Nesmith, W.C., Schard, C.L., Siegel, M.R. 1994. Use of specific repetitive sequences in *Peronospora tabacina* for the early detection of tobacco blue mold pathogen. *Phytopathology*. 84, 425-430.

Wild, C.P., Garner, R.C., Montesano, R., Tursi, F. 1986. Aflatoxin B₁ binding to plasma albumin and liver DNA upon chronic administration to rats. *Carcinogenesis*. 6, 853-858.

Wild, C.P. and Hall, A.J. 1996. Epidemiology of mycotoxin-related disease. in : Howard, J.D. & Miller D. eds, *The Mycota VI : Human and animal relationships*. Springer-Verlag, (Berlin) Heidelberg. 213-227.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafaiski, J.A., Tingey, S.V. 1991. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid. Res.* 18, 6531-6535.

Yokoyama, K., Wang, L., Miyaji, M., Nishimura, K., 2001. Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene. *FEMS Microbio Lett.* 200, 241_246.

Zepnik, H., Schauer., Dekant, W. 2001. Ochratoxin A-induced tumor formation: is there a role of reactive ochratoxin A metabolites? *Toxin Sci.* 59, 59-67.

Zhao, J., Kong, F., Li, R., Wang, X., Wan, Z., Wang, D. 2001 Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. *Journal of Clinical Microbiology.* 39, 2261- 2266.

Zimmerli, B. and Dick R.1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants.* 13, 655-668.

ANNEXE 1 (ANX 1)

I-Liste des produits utilisés

- Ethanol (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France)
- Isopropanol (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)
- Agarose Mol Bio Grade (Promega, Charbonnières, France)
- Nitrate de sodium (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France)
- Extrait de levure (Difco, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France)
- Extrait de malt (Difco, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France)
- Agar (Difco, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France)
- Peptone (Difco, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France)
- Sulfate d'ammonium (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France)
- Nitrate d'ammonium (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France)
- Sulfate de magnésium heptahydraté (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France)
- Phosphate de potassium monohydrogéné (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France)
- Phosphate de potassium dihydrogéné (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France)
- Catéchine (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)
- Chlorure de potassium (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)
- Chlorure de sodium (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)
- Chlorure d'ammonium (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)
- Chloroforme (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France)
- Méthanol pour CLHP (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France)
- Acétonitrile pour CLHP (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France)
- Acide chlorhydrique (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France)
- Hydroxyde de sodium (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France)
- Hydroxyde de potassium (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)
- Acide acétique (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)
- Acide DL-malique 99 % (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France)
- Tween 80 (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France)
- Sulfite de sodium (Na_2SO_3) (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France)

- Acide tartrique (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)
- D(+)-Glucose anhydre (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France)
- Fructose (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France)
- Saccharose (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France)
- Maltose (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France)
- Glycérol (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France)
- Borate de sodium (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France)
- Molybdate d'ammonium (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France)
- Sulfate de fer (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France)
- Sulfate de cuivre (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France)
- Sulfate de manganèse (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France)
- Sulfate de zinc (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France)
- Diethyl Pyrocarbonate (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)
- Polyethylene glycol 8000 (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)
- Tris (Euromedex, Paris, France)
- Tris (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)
- Sodium Dodecyl Sulfate (Euromedex, Paris, France)
- EDTA (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)
- Bromure d'Ethidium (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)
- Tris-Acétate, EDTA 50X (MP Biomedicals & Qbiogene, Illkirch, France)
- Enzyme de restriction: HaeIII. (MP Biomedicals & Qbiogene, Illkirch, France)

II-Appareils

- pH-mètre (Corning-EEL modèle 109)
- Chromatographie liquide à haute performance (CLHP) (BIO-TEK, Milan, Italie) avec une colonne C18 et logiciel (PC) d'exploitation (Kroma 3000)
- Chromatographie liquide à haute performance (CLHP) (Agilent 1100, G1313A, ALS) couplé d'un fluorimètre (Agilent 1100, G 1321A, FLD) avec une colonne RP-18 et logiciel d'exploitation (Chemstation).
- Autoclave
- Rotavapeur (Certomat RB Braun, Unimax 2010, Heidolph, Germany)

- Bain-marie (Bioblock Scientific, Polystat I ref. 33194 220 V)
- Mixeur (Type 418, Braun, Spain)
- Centrifugeuse (Jouan)
- Microcentrifugeuse (112, Sigma Aldrich, Saint Quentin France)
- Balance de précision (OSI, M-220 D, Denver Instrument)
- Balance de pesé: Sartorius B 610 S, (Mettler, type B6C 200, Mettler E Mettler)
- Etuves (Heraeus).
- Microscope (Leica, Leitz DM RB)
- Homogénéisateur (Ultra Thurax)
- Spectrophotomètre UV-visible (Philips PU 8600)
- Cuve d'électrophorèse, système horizontal (Embi Tec, San Diego, CA)
 - Système sous vide Visiprep de Supelco (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)
- Thermocycleur (Robocycler gradient 96 stratagene)
- Real time PCR (ABI PRISMR 7700; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).
- Table UV transilluminator

III-Oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés dans l'étude de la caractérisation moléculaire des espèces appartenant à la section flavi sont les suivants :

Gène	Amorce
ITS1	5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'
ITS4	5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'
IGSF	5' AAG GAA TTC AGG AAT TCT CAA TTG 3'
IGSR	5' GTC CAC CGG CAA ATC GCC GTG CG 3'

Résumé

L'étude de la dynamique des populations fongiques totales et mycotoxinogènes (OTA et AFB1) et du contenu de ces deux mycotoxines dans de raisins des vignobles libanais nous a permis de déterminer en premier lieu l'agent causal responsable de cette contamination. Il s'agit de l'espèce *Aspergillus carbonarius* responsable de la production de l'OTA et de l'espèce *Aspergillus flavus* responsable de la production de l'AFB1. Et, puisque la contamination en AFB1 semble être plus sérieuse, une étude portant sur l'influence de la température et de l'activité de l'eau (Aw) sur la croissance des champignons aflatoxinogènes et sur leur toxigénèse a été réalisée dans le but de mieux comprendre l'impact de ces deux facteurs importants.

Une caractérisation moléculaire des champignons aflatoxinogènes grâce à la PCR-RFLP ciblant l'espaceur inter génique (IGS) en utilisant l'enzyme de restriction Bgl II, nous a permis de différencier entre les espèces productrices de cette mycotoxine (*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*) sans toutefois passé par les techniques morphologiques longues et fastidieuses. Ceci rentre dans le cadre d'économiser le temps et le coût d'analyse et ouvre la porte sur la possibilité d'analyse par voie moléculaire qui s'avère une technique très précise, très rapide et beaucoup moins coûteuse.

Abstract

The study of the dynamics of the total and mycotoxigenic (OTA and AFB1) fungal populations and of the contents of these two mycotoxins in grapes of the Lebanese vineyards allowed us to determine the causal agent responsible for this contamination. The species *Aspergillus carbonarius* shows to be responsible for the production for the OTA and the species *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* were responsible for the production for the AFB1. And, since the contamination in AFB1 seems to be more serious, a study relating to the influence of the temperature and the water activity (Aw) on the growth of the aflatoxinogenic fungi and their toxigenesis was carried in order of better understanding of the impact of these two important factors.

A molecular characterization of the aflatoxinogenic fungi through the PCR-RFLP targeting the intergenic spacer (IGS) using the restriction enzyme Bgl II, make possible the differentiation between the two major producing species of this mycotoxin (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*) without using long and fastidious morphological techniques. This returns within the framework to save the time and the cost of analysis and opens the door on the possibility of the molecular analysis which proves to be a very precise, very fast technique and much less expensive.