

N° d'ordre :

THESE

Présentée

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
TOULOUSE

Ecole doctorale : Transferts, Dynamique des Fluides, Energétique et Procédés
Spécialité: Génie des procédés et de l'environnement

Par : M. NGUYEN MINH TRI

IDENTIFICATION DES ESPÈCES DE MOISSURES, POTENTIELLEMENT
PRODUCTRICES DE MYCOTOXINES DANS LE RIZ COMMERCIALISE DANS CINQ
PROVINCES DE LA REGION CENTRALE DU VIETNAM - ETUDE DES CONDITIONS
POUVANT REDUIRE LA PRODUCTION DES MYCOTOXINES

Soutenue le _____ 2007 devant le jury composé de :

Pr. Pierre Strehaiano
Pr. Annie Pfohl-Leszkowicz
Pr. Tran Thi Luyen
Pr. Chakib El Adlouni
Pr. Philippe Dantigny
Dr. Virginie Marquis

Président
Directeur de thèse
Codirecteur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur

INTRODUCTION

Les céréales sont des aliments de base de l'alimentation humaine et animale. Au Vietnam, le grain le plus important est le grain de riz.

Les aspects qualitatifs et sanitaires sont très importants. Un des critères importants de la qualité sanitaire des céréales est la contamination en mycotoxines. La présence de moisissures et de toxines dans les aliments est devenue un sujet de préoccupation pour les professionnels de la santé, ainsi que pour le commerce mondial.

Les mycotoxines sont des molécules toxiques issues du métabolisme secondaire de certaines espèces de moisissures qui se développent sur un aliment. Si la toxine est en quantité suffisante dans l'aliment, elle peut provoquer une intoxication chez le consommateur. Une intoxication aiguë est la conséquence d'une ingestion massive de la toxine ; elle peut aboutir à la mort après diverses manifestations (nausées, léthargie...). L'intoxication chronique, en revanche, se produit à long terme et se traduit, par exemple pour les aflatoxines, par des infiltrations graisseuses et est à l'origine de cancers.

Un grand nombre d'espèces de moisissures appartenant principalement aux trois genres très communs *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, présents dans l'air ambiant, le sol, sur les cultures (...) sont capables, en se développant par exemple sur certains substrats tels que l'arachide, le café, les produits céréaliers, les céréales, le raisin (...) de synthétiser et d'excréter des mycotoxines. Les mycotoxines les plus couramment rencontrées, et faisant l'objet d'une surveillance régulière, sont les aflatoxines, les ochratoxines.

Mais la présence de moisissures productrices de mycotoxines sur une denrée alimentaire ne signifie pas toujours qu'une mycotoxine est produite.

La mycotoxinogénèse (la condition de synthèse et d'excrétion des mycotoxines) est un phénomène d'une grande complexité. Les conditions optimales de la toxinogénèse dépendent d'une combinaison des facteurs température et humidité ainsi que de l'oxygénation au niveau du substrat. La plupart des moisissures se développent entre 15 et 30°C.

Les *Aspergillii* se plairont plutôt vers 30°C sous des climats tropicaux, chauds et humides (comme au Vietnam).

Les *Penicillia* (70-80 % de ses espèces sont aptes à synthétiser des mycotoxines) ou les *Fusaria* se développeront plutôt vers 20-25 °C et elles sont couramment rencontrées dans les climats tempérés ; les *Penicillia* peuvent également croître à des températures assez fraîches (< 10°C).

L'étude des conditions les plus significatives contrôlant la production de mycotoxines par les espèces de moisissures nous aidera à contrôler la production des mycotoxines au cours du stockage du riz décortiqué.

Ce travail de thèse est présenté comme suit :

- Bibliographie sur les mycotoxines et leurs conditions de formation.
- Résultats: Ils seront présentés dans trois chapitres:
 - Chapitre I : Evaluation des teneurs en aflatoxine B1, citrinine et ochratoxine A du riz décortiqué commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam.
 - Chapitre II : Isolement des souches de moisissure qui produisent des mycotoxines (aflatoxine B1, citrinine, et ochratoxine A) à partir des grains de riz provenant de ces régions.
 - Dans le chapitre III, nous avons étudié les conditions (activité de l'eau et température) contrôlant la production des mycotoxines.

Les résultats sont présentés sous forme de publications. Des résultats complémentaires sont également apportés et discutés dans chaque partie.

- Conclusion générale et perspectives.

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) France, sous la direction scientifique de Madame la Professeure Annie LESZKOWICZ et au

- Laboratoire de l'Institut de Biotechnologie et Environnement au sein de l'Université de Nha Trang, Vietnam, sous la codirection de Madame la Professeure Tran Thi Luyen.

Qu'elles reçoivent ma profonde reconnaissance et mes remerciements sincères.

Je tiens à remercier tous les membres du jury d'avoir accepté d'y participer.

J'adresse mes remerciements à M. le Professeur Ahmed LEBRIHI, à MM. Le Hong Khanh et Dao Huy Phong qui m'ont aidé et encouragé dans la recherche d'un financement de cette thèse.

Je tiens à remercier l'Ambassade de France au Vietnam et le Gouvernement Français de m'avoir fait confiance en m'octroyant une bourse de doctorat.

Mes remerciements vont aussi à M. Nguyen Hoang Phuong, à M. Raymond Kraemer et à Anh Liem-Chi Huong qui m'ont apporté aide et soutien lors de mes séjours en France.

Je n'oublie pas l'accueil amical de toutes les personnes des laboratoires en France et au Vietnam :

Phong, Virginie, Delphine, Mariana, Hend, Ali, Awanwee,

Anh Nghia, Trung, Chi HueAn, Tung, Tu, Binh, Son, Nga, Thuy, Khanh, Phuong, Trang, Thuc, Dat, ...

SOMMAIRE

Remerciements	1
Introduction	2
Sommaire	4
Liste des figures et des tableaux	7
Liste des abbréviations	10
Partie 1 : Généralités	11
1. Climat tropical et mousson au Vietnam	12
2. Moisissures et mycotoxines dans les denrées alimentaires et dans le riz	13
3. Ecotoxicogenèse	20
3.1. Substrat	20
3.2. Activité de l'eau et croissance microbienne	21
3.3. Température	22
3.4. Composition gazeuse	22
3.5. Interactions entre organismes	23
4. Mycotoxines et toxinogenèse	24
4.1. Aflatoxine	26
4.2. Citrinine	32
4.3. Ochratoxine A	33
5. Caractéristiques des espèces productrices de trois mycotoxines de stockage	36
5.1. <i>Aspergillus</i> et téléomorphes relatifs	36
5.2. <i>Penicillium</i> et genres relatifs	44
6. Approches de décontamination	47
Objectif de ce travail	54
Partie 2 : Résultats	56
1. Les mycotoxines : aflatoxin B1, citrinine et ochratoxine A dans le riz de cinq provinces de la région centrale du Vietnam	57
1.1. Méthode d'analyse simultanée de l'AFB1, la CIT et l'OTA	57

1.1.1.	Introduction des méthodes de dosage d'AFB1, CIT et OTA	57
1.1.2.	Matériels et méthodes	62
1.1.3.	Procédure d'analyse simultanée d'AFB1, CIT et OTA	64
1.1.4.	Résultats et discussion	65
1.2.	Occurrence de aflatoxine B1, citrinine et ochratoxine A dans le riz de cinq provinces de la région centrale du Vietnam	68
1.2.1.	Échantillonnage	68
1.2.2.	Résultats et discussion	68
1.2.3.	Conclusion	74
2.	Identification de la mycoflore et choix des souches de moisissure produisant des mycotoxines (AFB1, CIT et OTA) dans le riz des cinq provinces de la région centrale du Vietnam.	75
2.1.	Identification de la mycoflore	75
2.1.1	Méthodes pour l'isolement, la numération et l'identification	75
2.1.2.	Matériels et méthodes	81
2.1.3.	Résultats et discussion	81
2.2.	Des souches productrices des mycotoxines : AFB1, CIT et OTA	84
2.2.1.	Points concernant la sélection des souches productrices des mycotoxines	84
2.2.2.	Matériels et méthodes	84
2.2.3.	Résultats et discussion	85
3.	Seuil minimal de l'activité de l'eau pour la production des mycotoxines sur le riz et proposition des conditions de conservation du riz dans un climat tropical	89
3.1.	L'effet de l'humidité de l'air à la température 25/30°C sur la production d'aflatoxine B1 de <i>A. parasiticus</i> dans le riz.	89
3.1.1.	Matériels et méthodes	89
3.1.2.	Résultats et discussion	91
3.2.	L'effet de l'humidité de l'air à la température 25/30°C sur la production de citrinine de <i>P. citrinum</i> dans le riz.	95
3.3.	L'effet de l'humidité de l'air à la température 25/30°C sur	96

	la production d'ochratoxine A d' <i>A. niger</i> dans le riz.	
3.4.	Seuil minimal de l'activité de l'eau pour la production des mycotoxines sur le riz	97
3.5.	Déterminant des conditions pour conservation de riz	98
	Conclusion générale	99
	Perspectives et propositions	100
	Références et Annexe	101
	REFERENCES	102
Annexe	Composition des milieux de culture	117
Article 1.	Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of central region in Vietnam	120
Article 2.	A survey of mycoflora and mycotoxin - producing strains in rice from five provinces of the central region of Vietnam	126
Article 3.	Effect of relative humidity of the air and temperature on aflatoxin B1 production of <i>A. parasiticus</i> in rice	135

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1	Cart du Vietnam et localisation des cinq provinces	12
Figure 2	Voie métabolique de l'aflatoxine B1	27
Figure 3	Adduit à l'ADN de l'aflatoxine B1	27
Figure 4	Interaction entre AFB1 et virus d'hépatite B	28
Figure 5	Voie de biosynthèse des aflatoxines	30
Figure 6	Structures chimiques des aflatoxines	31
Figure 7	Structures isomériques de citrinine	32
Figure 8	Structure chimique de l'ochratoxine A	34
Figure 9	Schéma de la métabolisation de l'ochratoxine A	35
Figure 10	Caractères morphologiques des <i>Aspergillii</i>	37
Figure 11	Colonie d' <i>Aspergillus parasiticus</i> sur CYA, MEA, G25N à 25°C après 7 jours (de gauche à droite)	38
Figure 12	Colonie d' <i>Aspergillus parasiticus</i> sur AFPA à 30°C, après 3 jours, Colonie (A) et son revers (B)	38
Figure 13	Colonie d' <i>Aspergillus niger</i> sur CYA à 25°C (gauche) ; la tête (droite)	40
Figure 14	Colonie d' <i>Aspergillus versicolor</i> sur MEA à 25°C, après 7 jours. colonie (gauche) ; la tête (droite)	42
Figure 15	Caractères morphologiques des <i>Penicillia</i> (a) Pinceau monoverticillé (b) biverticillé (c) biverticillé fourchu (furcatum) (d) terverticillé	44
Figure 16	Colonie de <i>P. citrinum</i> sur medium CYA (gauche) et les têtes de conidies (droite)	45
Figure 17	Courbes isothermes de sorption d'une céréale à 20°C	52
Figure 18	Riz non-décortiqué (gauche) et décortiqué (droite)	54
Figure 19	Au Vietnam, le riz vendu au marché sans emballage	54
Figure 20	Etapes de bases de la détermination des mycotoxines.	58
Figure 21	Schéma d'une chaîne HPLC	59

Figure 22	Comparaison des chromatogrammes de séparation des mycotoxines isolés d'un riz contaminé (noir) et d'un riz non-contaminé enrichi en mycotoxines standard (rose).	65
Figure 23	Evolution des chromatogrammes d'aflatoxines (A) protégé de la lumière ; (B) lumière / 4h (C) lumière / 24h	67
Figure 24	Taux d'échantillons contaminés AFB1, CIT et OTA dans le riz de cinq provinces.	70
Figure 25	Moyenne d'échantillons contaminés AFB1, CIT et OTA dans le riz de cinq provinces.	71
Figure 26	La co-contamination de mycotoxines.	73
Figure 27	Colonies de moisissures sur DG18 (Dichlorane 18% Glycérol Agar) ensemencé des grains de riz	76
Figure 28	Schéma de culture des isolats fongiques (souche 1 et 2) destinés à leur identification.	78
Figure 29	Colonie d' <i>A. parasiticus</i> sur agar de noix de coco (gauche) et sa fluorescence sous l'UV (droite).	86
Figure 30	Chromatogramme de l'AFB1 et B2 isolé du milieu CA ayant permis à la culture d' <i>A. parasiticus</i> .	86
Figure 31	Fluorescence sous la lumière d'ultraviolet de la colonie de <i>P. citrinum</i> sur milieux DG18 (Dichlorane 18% Glycérol Agar), MEA (agar d'extrait de malt), CA (agar de noix de coco) et CYA (Agar de Czapek et Extrait de levure) (de gauche à droite).	87
Figure 32	Chromatogramme de CIT extrait du milieu de CA ayant permis la culture de <i>Penicillium citrinum</i>	87
Figure 33	Chromatogramme de CIT et OTA extrait du milieu CYA ayant permis culture de <i>Aspergillus niger</i>	88
Figure 34	Hygromètre électronique	90
Figure 35	Variation de l' a_w du riz pendant le stockage en fonction de l'humidité relative.	92
Figure 36	AFB1 (ng/g) dans le riz stocké dans différentes conditions.	93
Figure 37	Quantité de citrinine (ng/g) dans le riz en fonction de différentes conditions de stockage.	95

Figure 38	Relation entre l'activité de l'eau et la teneur en eau.	98
Figure 39	Scelleuse	96
Tableau 1	Exemple de produits contaminés par des moisissures toxigènes	16
Tableau 2	Activité de l'eau minimale pour la croissance de moisissures xérophiles	21
Tableau 3	Propriétés physiques et chimiques d'aflatoxines	29
Tableau 4	Méthodes de lutte contre la contamination	48
Tableau 5	Moyenne de récupération et la déviation standard relative pour chaque mycotoxine	65
Tableau 6	Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ) de l'AFB1, CIT et OTA extrait du riz	66
Tableau 7	Résultat des contaminations en mycotoxines de l'ensemble des 100 d'échantillons de riz collectés dans les 5 provinces de la région centrale du Vietnam.	68
Tableau 8	Répartition des contaminations en fonction de la provenance du riz de chaque de cinq provinces de région centrale de Vietnam.	69
Tableau 9	Pourcentage d'échantillons contaminés simultanément par deux : mycotoxine (A) rapporté au nombre total d'une autre mycotoxine (B).	72
Tableau 10	Evaluation de la quantité et de la nature des moisissures présentes dans 50 échantillons du riz préalablement désinfectés en surface	83
Tableau 11	Variation de l' a_w du riz exposé au cours de stockage en fonction de l'humidité relative à la température 25°C.	92
Tableau 12	Quantité d'AFB1 (ng/g) produite dans le riz en fonction de différentes conditions de stockage.	93
Tableau 13	Quantité de citrinine (ng/g) produite dans le riz en fonction de différentes conditions de stockage.	95
Tableau 14	Quantité d'ochratoxine A (ng/g) produite dans le riz en fonction de différentes conditions de stockage.	96

LISTE DES ABREVIATIONS

AF	Aflatoxine
AFB1	Aflatoxine B1
AFB2	Aflatoxine B2
AFG1	Aflatoxine G1
AFG2	Aflatoxine G2
AFPA	<i>Aspergillus flavus</i> et <i>parasiticus</i> agar
<i>A. parasiticus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>
<i>A. versicolor</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>
a _w	Activité de l'eau
CA	<i>Coconut Agar</i> - agar de noix de coco
CIT	Citrinine
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
CYA	<i>Czapek Yeast Extract Agar</i> - Agar de Czapek et Extrait de levure
DG18	Dichlorane 18% Glycérol Agar
<i>E. chevalieri</i>	<i>Eurotium chevalieri</i>
G25N	25% Glycérol Nitrate Agar
HR	Humidité relative
HRE	Humidité relative d'équilibre
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
MEA	<i>Malt Extract Agar</i> - Agar d'extrait de malt
OTA	Ochratoxine A
OMS	Organisme Mondial de la Santé
<i>P. citrinum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i> - Deviation standard relative
TDI	<i>Total Daily Intake</i> = DJA dose journalière admissible
UV	Ultra Violet

Partie 1 : Généralités

1. Climat tropical et mousson au Vietnam.
2. Moisissures et mycotoxines dans les denrées alimentaires et dans le riz.
3. Ecotoxicogenèse
4. Mycotoxines et toxinogenèse
5. Quelques espèces fongiques concernant ce travail.
6. Méthodes pour réduire les contaminations

1. Climat tropical et mousson au Vietnam

Le territoire du Vietnam a une situation particulière dans la région «Asie mousson». Le Vietnam est au sud-est du continent le plus vaste du monde (Asie). Sa largeur est étroite, par contre le territoire longe le méridien sur une très longue distance. Le climat du Vietnam de type tropical, climat de mousson, est caractérisé par une température moyenne comprise entre 22°C et 30°C et un fort taux d'humidité.

La région centrale du Vietnam est étroite et longue. Ceci explique qu'il y ait une variation climatique nette entre le Nord et le Sud.

La région étudiée dans cette thèse est le sud de la région centrale du Vietnam comprenant cinq provinces : Quang Nam, Quang Ngai, Binh Dinh, Phu Yen et Nha Trang (Figure 1). Cette région a deux saisons : (i) la saison des pluies (d'août à décembre), les mois les plus pluvieux sont octobre et novembre (500-600 mm / mois) ; (ii) la saison sèche (de janvier à juillet), les mois les plus secs sont mars et avril (15-25 mm / mois). La température moyenne annuelle est de 26°C (la température moyenne du mois le plus froid est de 22°C et la température moyenne du mois le plus chaud est de 30°C).

Les provinces du Nord : Quang Nam-Quang Ngai, ont une humidité très élevée dont le taux moyen peut atteindre 90% ; et l'humidité baisse légèrement



Figure 1 : Carte du Vietnam et localisation des cinq provinces

dans les provinces plus au Sud : Binh Dinh- Phu Yen- Nha Trang avec un taux de 80% (DAN, 1993).

2. Moisissures et mycotoxines dans les denrées alimentaires

Depuis l'époque initiale où l'homme a commencé à cultiver les céréales et stocker les aliments, la détérioration par les moisissures est inévitable. L'aliment est progressivement envahi par un fin duvet (le mycélium) blanc, noir, vert, orange, rouge et brun. Ces moisissures acidifient, décolorent, font fermenter et rendent ces produits désagréables voire dangereux (Pitt, 1997).

Jusqu'à récemment, les moisissures étaient généralement considérées comme une simple détérioration inesthétique des aliments, à l'exception de *Claviceps purpurea* relié à une maladie de l'homme depuis 200 ans. Les scientifiques japonais ont mis en évidence la nature toxique du riz jaune il y a 100 ans, mais ce n'est que 70 ans plus tard que l'implication des moisissures a été confirmée. L'ATA (l'aleucie toxique alimentaire) a tué des milliers d'hommes à l'Est de la Russie entre 1942 et 1947, bien qu'en 1950 il ait été suspecté que l'agent causal soit la toxine T-2, ce n'est que 25 ans après que cela a été confirmé (Pitt, 1997).

C'est réellement à partir de 1960, qu'on a pris conscience que les moisissures pouvaient produire des toxines significantes (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005).

Les moisissures sont des champignons filamenteux hétérotrophes qui ont des actions bénéfiques mais aussi néfastes pour l'homme. Ils sont ubiquitaires. Les aliments sont généralement des milieux très favorables à leur développement. Plusieurs moisissures notamment les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* sont connues pour être des contaminants des produits agricoles et/ou pour leur capacité à produire des métabolites secondaires toxiques (Cahagnier *et al.*, 1998 ; Doyle *et al.*, 1998 ; Meyer *et al.*, 2004).

L'appareil végétatif des champignons est un thalle composé de filaments (hyphes) ramifiés dont l'ensemble constitue le mycélium. Ils se reproduisent

grâce à des spores. Celles-ci sont issues soit d'une reproduction sexuée (champignon téléomorphe) ou d'une multiplication asexuée (champignon anamorphe). Certains champignons, chez qui les deux formes coexistent sont appelés holomorphes. Différents groupes de moisissures ont été définis suivant leur mode de reproduction sexuée et les caractéristiques de leur spore. *Zygomycètes* possèdent des spores contenues à l'extérieur d'une cellule renflée, *Ascomycètes* ont des spores regroupées dans des sortes de sacs, *Basidiomycètes* qui ont des spores portées par des basides, et *Hyphomycètes*. Ces derniers sont un groupe hétérogène dont on ne connaît pas actuellement, pour la plupart, la forme de reproduction sexuée (Kiffer et Morelet, 1997 ; Cahagnier *et al.*, 1998). Moisissures se rencontrent dans tous les groupes en particulier dans les *Hyphomycètes* mais sont assez peu nombreuses chez *Basidiomycètes*. Dans le cas d'une reproduction asexuée, il y a une formation, à partir d'un hyphe spécialisé nommé conidiophore, de spores mitotiques qui sont des excroissances appelées conidies.

Les moisissures sont ubiquitaires et présentent des avantages économiques intéressants pour l'homme. Dans les milieux naturels, elles contribuent, avec d'autres microorganismes, à la biodégradation et au recyclage des matières organiques comme la litière ou le bois. Certaines sont utilisées dans l'alimentation, comme *Penicillium roquefortii* et *P. camembertii* pour la production de fromages, d'autres sont exploitées pour la production d'enzymes (40% des enzymes produits industriellement), d'acides organiques (acide citrique et gluconique par des espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium*), de médicaments (production de pénicilline par *P. chrysogenum*, de céphalosporine par *Cephalosporium acremonium*) (Carlile et Watkinson, 1997 ; Kiffer et Morelet, 1997 ; Perry *et al.*, 2004). Environ 22% des antibiotiques identifiés sont produits par les champignons filamenteux (Strohl, 1997). Il est à noter que la production de biomasse de *P. chrysogenum* sert aussi d'engrais ou d'aliment pour le bétail (Kiffer et Morelet, 1997).

A côté des effets très bénéfiques et positifs des champignons dans la vie courante, ils sont capables de provoquer également d'importantes détériorations,

notamment dans le domaine agronomique. La contamination fongique des denrées alimentaires, destinées à l'homme ou à l'animal, est le principal dommage qui va entraîner de nombreux problèmes. Ainsi, la présence indésirable des moisissures modifie l'aspect des produits alimentaires, dû notamment à la production de pigments, comme par exemple un pigment foncé, la mélanine (Bulter et Day, 1998). Le développement de ces champignons sur les aliments peut leur donner des odeurs moisis. Il y a donc une réduction quantitative et qualitative de la valeur alimentaire de la denrée, et une baisse du rendement des récoltes. Les métabolites produits par ces champignons lors de leur croissance sont aussi des éléments majeurs dans l'altération des denrées alimentaires. Des manifestations dans la qualité organoleptique (en modifiant le goût de la denrée par exemple) mais aussi de graves problèmes sanitaires surgissent, comme par exemple des risques d'intoxication due à la présence de mycotoxines. Ainsi, l'apparition de mycoses et d'allergies chez l'homme peut résulter de l'ingestion des denrées contaminées par des moisissures (Krogh, 1987).

Toutes ces « épidémies » passent plus ou moins inaperçues des « autorités sanitaires » de ces époques, et il faut attendre l'année 1960 pour qu'on prenne conscience que ces moisissures ne sont pas que de simples souillures sur des denrées alimentaires et qu'elles peuvent être toxiques. En effet, aux alentours de Londres, des élevages de dindons sont atteints d'une grave intoxication, appelée « maladie X des dindons », provoquée par l'ingestion de tourteaux d'arachide en provenance du Brésil. Pour la première fois, la relation est établie entre une intoxication et la présence d'une moisissure (*Aspergillus flavus*) parasitant les champs d'arachide ; un an plus tard, les Anglais isolent une des molécules responsables, l'aflatoxine B1 (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005).

Tableau 1 : Exemple de produits contaminés par des moisissures toxigènes
(Pfohl-Leszkowicz, 1999)

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

Les recherches ultérieures amenèrent la découverte d'autres aflatoxines et aboutirent à la mise en évidence d'un pouvoir cancérigène intense de certaines de ces toxines, entraînant ainsi le début de travaux scientifiques d'envergure ; aujourd'hui, la liste de ces mycotoxines est impressionnante et ne cesse de s'allonger. Le développement des « Micromycètes » à la surface et dans les produits destinés à l'alimentation est en effet très souvent constaté, en particulier dans les denrées stockées. Or l'étalement dans le temps de la consommation (fruits saisonniers consommés toute l'année) et le transport à longue distance des aliments nécessitent de plus en plus le stockage. Des solutions doivent donc être trouvées pour enrayer, au moins partiellement, une dispersion de ces moisissures engendrée par nos nouvelles habitudes de consommation (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005).

Les substances contaminées sont très diverses. Toutes les denrées alimentaires peuvent être détériorées. Ceci est présenté dans le table 1.

Contamination des céréales par les mycotoxines

Les céréales sont les principaux vecteurs de mycotoxines 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 sont les vecteurs. Ce sont dans les pays aux conditions climatiques chaudes et humides (et donc en particulier les pays d'Afrique, d'Asie du Sud et d'Amérique du Sud) que la croissance des champignons toxinogènes (surtout ceux produisant les aflatoxines) est la plus favorisée. Ainsi, le riz, le maïs et le millet, aliments de base des populations de ces pays, sont souvent contaminés par les aflatoxines. Environ 55 millions de tonnes de céréales sont perdus chaque année dans le monde (Pfohl-Leskowicz, 1999).

Les études mycologiques sur les céréales sèches révèlent souvent des quantités importantes de moisissures de champ, particulièrement des espèces

d'*Alternaria* et de *Fusarium*, ainsi que les mycètes xérophiles capables de provoquer la détérioration du substrat.

Les causes les plus communes de la détérioration des céréales sèches sont des espèces d'*Eurotium*, en particulier *E. chevalieri*, *E. repens*, *E. rubrum*, *E. amstelodami*, et *Aspergillus penicillioides*. Les *A. penicillioides* sont probablement les espèces pionnières dans le développement des populations fongiques dans les grains stockés. Dans le blé stocké à une a_w de 0,68 pendant 12 mois, on observe le développement des *A. penicillioides*, puis plus tard des espèces d'*Eurotium* et *Wallemia sebi*. *Wallemia* et d'autres espèces d'*Aspergillus* sont généralement présents sur les céréales stockées ; mais à l'exception possible d'*A. candidus*, ils causent relativement rarement la détérioration (Pitt, 1997).

Les niveaux de *Penicillia* sont souvent élevés, reflétant sans doute la croissance pendant la période de séchage. Cependant quelques espèces peuvent avoir des associations spécifiques avec des céréales particulières et être capables de se développer avant la moisson. Les espèces les plus communes dans le blé, l'orge et l'avoine sont des *Penicillia*, particulièrement *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. brevicompactum* et *P. crustosum* (Scudamore *et al.*, 1993 ; Mills *et al.*, 1995 ; Filtenborg *et al.*, 1996). *P. verrucosum* a une association spécifique avec l'orge en Europe. *P. citrinum* et le *P. glabrum* sont omniprésents.

Dans le riz et d'autres petits grains stockés dans les conditions tropicales, d'autres sous-genres de *Penicillia* (en particulier *Biverticillium* et *Furcatum*) sont plus commun. *P. citrinum* est l'espèce de *Penicillium* la plus commune dans les échantillons de riz décortiqué provenant de Thaïlande, d'Indonésie et des Philippines. *P. islandicum* est présent dans 5% des échantillons provenant d'Indonésie, mais est rarement détecté dans les échantillons provenant des Philippines, et absent du riz provenant de Thaïlande (Pitt *et al.*, 1994). L'*Aspergillus* et l'*Eurotium* sont les composants les plus importants de la flore fongique de stockage en conditions tropicales par rapport aux espèces de *Penicillium*. Les espèces les plus fréquentes sont les quatre espèces communes d'*Eurotium* et les six *aspergilli* suivant : *A. flavus*, *A. candidus*, *A. niger*, *A. versicolor*, *A. wentii* et *A. fumigatus* (AbdelAzim et Khalil, 1979 ; Mheen *et al.*,

1982 ; Jayaraman et Kalyanasundaram, 1990 ; Pitt *et al.*, 1994). Dans 139 échantillons de riz indonésiens, l'espèce la plus souvent retrouvée était *A. candidus*, présent dans 56% d'échantillons, infectant parfois jusqu'à 100% des grains, suivie *E. chevalieri*, *A. flavus*, *E. rubrum*, *A. fumigatus* et *A. niger*. Dans 73 échantillons de riz des Philippines, c'est *A. flavus* qui était l'espèce la plus commune (présent dans 53% d'échantillons), suivies par *A. candidus*, *E. chevalieri*, *A. fumigatus* et *A. niger* (Pitt *et al.*, 1997).

Le jaunissement du riz pendant le stockage a été attribué à l'activité fongique. Cela peut se produire dans le grain sec, mais peut plus étroitement être lié à la croissance des moisissures avant et pendant le séchage plutôt que pendant le stockage. Bien que *Penicillium islandicum* ait été impliqué, les espèces exactes des moisissures responsables et leur rôle dans le jaunissement du riz restent encore à déterminer (Pitt *et al.*, 1997).

Le riz non-décortiqué du sud-est de l'Asie comporte une grande variété de mycètes. Les moisissures principales sont *Trichoconiella padwickii* (*alternaria*), *Curvularia* sp., *Fusarium semitectum*, *Bipolaris oryzae*, *Nigrospora oryzae*, *Chaetomium* sp., *Phoma* sp., *Diplodia maydis* (Iizuka, 1957, 1958 ; Majumder, 1974 ; Kuthubutheen, 1979 ; Pitt *et al.*, 1994). Mallick et Nandi (1981) ont isolé les mêmes moisissures du riz indien immédiatement après récolte. Sur le riz non-décortiqué égyptien, certaines espèces d'*Aspergillus* (*A. flavus*, *A. sydowii*, *A. terreus*, *A. fumigatus* et *A. ochraceus*) et certaines espèces de *Penicillium* (*P. chrysogenum* et *P. corylophilum*) ont été isolées, avec *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Trichoderma viride*, *Mucor racemosus* (Abdel-Hafez *et al.*, 1987). Le riz non-décortiqué est contaminé à des taux élevés par des mycètes de champ, notamment *Fusarium semitectum*, *Bipolaris oryzae*, et *Curvularia* sp., *Phoma* sp. et *Colletotrichum* sp.. Cependant, une fois le riz décortiqué, il est très peu contaminé par des mycètes, qui sont pour la plupart d'origine de stockage (Pitt *et al.*, 1994). Les espèces d'*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Alternaria* ont été isolées des échantillons de riz non-décortiqué, et de riz poli coréen. *Aspergillus* est le genre dominant pendant le stockage ; *P. citrinum* et *A. candidus* étaient les espèces prédominantes infectant

les échantillons, suivis des espèces d'*Alternaria* et d'*A. versicolor* (Mheen *et al.*, 1982 ; Park *et al.* 2005). Les espèces rapportées de *Penicillium* telles que *P. citrinum* et *P. islandicum* sont prédominantes dans les échantillons de riz décortiqué de l'Argentine et du Paraguay (Tonon *et al.* 1997). Chandra et Sarbhoy (1997) ont isolé *A. flavus*, *A. niger*, *Alternaria*, *Penicillium* spp., mais aussi *Fusarium* spp. (*F. solani*, *F. moniliforme*, et *F. graminearum*) sur des échantillons de riz polis en Inde.

3. Ecotoxicogenèse

En général, plus d'une mycotoxine vont être trouvées sur un substrat contaminé. Quelques moisissures sont capables de produire plusieurs mycotoxines et quelques mycotoxines sont produites par différentes espèces fongiques (Hussein, 2001). Les facteurs qui affectent la formation de mycotoxines incluent la teneur en eau, la température, le temps de stockage, les dommages aux enveloppes des graines, la présence d'oxygène et de dioxyde de carbone, la composition du substrat, la prédominance d'espèces toxigènes, la dispersion des spores, les interactions microbiennes et la présence d'insectes (Pitt *et al.*, 1997 ; Pfohl-Leszkowicz, 1999).

3.1. Substrat

Un champignon n'est pas forcément capable de se développer sur n'importe quel substrat. Ainsi, l'aflatoxine (AF) ne se forme quasiment jamais dans le soja. Cela est sans doute dû au fait de la présence d'inhibiteurs à l'état de trace comme le zinc ou de protéine de petit poids moléculaire. La composition qualitative et quantitative en certains nutriments (sucre, notamment) influe sur la contamination en AF. L'AF contamine surtout les noix, pistaches, amandes et céréales poussant dans les contrées chaudes. La situation aux champs est complexe puisque la croissance d'un champignon peut être influencée par les pratiques culturales. Ainsi le désoxynivalénol contamine le blé d'hiver planté après du maïs, alors qu'il n'y a pas de contamination si la culture s'effectue après

une plantation de soja ou d'orge. Les arachides et le soja sont plus fréquemment contaminés par l'OTA formée par *Aspergillus alutaceus* que le colza, le blé ou le maïs, alors que le meilleur substrat pour la production d'OTA par *P. verrucosum* est le maïs. La CIT est produite seulement par *P. verrucosum* dans le blé et le maïs. Cette spécificité de substrat provient de différences physiques (activité de l'eau, conductivité thermique, oxygénation) et chimiques (composition en lipides, protéines, acides aminés, acide gras, minéraux). L'acide phytique diminue la synthèse d'AF alors que la proline stimule la production par *A. parasiticus* et *A. flavus*. De même, la proline et l'acide glutamique stimulent la synthèse d'OTA par *A. alutaceus* et *P. verrucosum*. Il y a une proportionnalité entre le taux de protéines contenu dans l'orge et l'apparition d'OTA (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

3.2. Activité de l'eau et son action sur la croissance microbienne

L'activité de l'eau (a_w) est un concept physico-chimique, introduit par Scott (1957). Il a été montré qu'il y a une relation entre l'humidité dans l'aliment et la capacité de croissance microbienne.

Tableau 2 : Activité de l'eau minimale pour la croissance des moisissures xérophiles (Pfohl-Leszkowicz, 1999)

Champignon	a_w	t°C	Produits d'isolement	Références
<i>Aspergillus flavus</i>	0,84	25	Lait en poudre	Pitt & Hocking, 1977
<i>Aspergillus versicolor</i>	0,83	22	Blé en cours de stockage	Pelhate, 1968
<i>Aspergillus sydowii</i>	0,79	25	Poisson séché indonésien	Wheeler & Hocking, 1988
<i>Aspergillus candidus</i>	0,79	25	Poisson séché indonésien	Wheeler & Hocking, 1988
<i>Aspergillus restrictus</i>	0,77	22	Blé en cours de stockage	Pelhate, 1968
<i>Aspergillus penicilloides</i>	0,73	25	Poisson séché indonésien	Andrews & Pitt, 1987
<i>Aspergillus wentii</i>	0,74	25	Poisson séché indonésien	Andrews & Pitt, 1987
<i>Penicillium restrictum</i>	0,84	25	Non précisé	Hocking & Pitt, 1977
<i>Penicillium expansum</i>	0,82	25	Non précisé	Hocking & Pitt, 1977

La plupart des moisissures préfèrent une a_w entre 0,85 et 0,99 pour leur développement. L' a_w minimale permettant le développement de la plupart des champignons contaminant les céréales est de 0,7. Certaines moisissures xérophiles (*A. flavus* ou *P. restrictis*) peuvent se développer dans les fruits secs, le lait en poudre, les confitures, charcuteries sèches dont l' a_w est plus faible (Tableau 2). Généralement, les espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* sont des contaminants typiques des céréales de stockage tandis que les espèces de *Fusarium* préfèrent le milieu dont l' a_w est plus élevée.

3.3. Température

Les moisissures peuvent se développer entre 0°C et 35°C. Certaines espèces sont capables de se développer à des températures extrêmes : *Cladosporium herbarum* peut se développer à des températures inférieures à 0°C et *A. flavus* ou *A. fumigatus* jusqu'à 60°C. En général, la température optimale de toxinogénèse est voisine de la température optimale de croissance. Pour d'autres toxines, telles que la zéaralénone élaborée par *F. roseum*, la température optimale de toxinogénèse est généralement inférieure à celle de la croissance, respectivement 15 et 25°C. 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 *F. tricinctum* (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

3.4. 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 inhibiteur important sur la toxinogénèse. La production d'aflatoxines dans l'arachide est modérément réduite pour des taux d'O₂ entre 5 et 21%. Par contre elle est inhibée lorsque la proportion en O₂ est inférieure à 1 %. L'augmentation de la teneur en CO₂ (20 %), surtout si elle est associée à une réduction en oxygène, provoque une chute importante de la production d'aflatoxines. Dans

une atmosphère confinée, telle qu'elle se présente dans un ensilage mal tassé, *F. roseum* peut encore élaborer de la zéaralénone. *B. nivea* est anaérobie et produit de la patuline même en anaérobiose (Le Bars *et al.*, 1987). 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 toxinogénèse.

3.5. Interactions entre organismes

Les insectes et acariens 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'arachide, de coton, de maïs par *A. flavus* ou les aflatoxines avant la récolte est souvent liée à l'attaque par les insectes. Dans le stockage, les échantillons de grain hébergeant des charançons révèlent en général une population fongique importante et parfois des mycotoxines (l'AFB1, l'OTA, la CIT dans le maïs ou l'orge).

La présence simultanée de micro-organismes (bactéries ou moisissures) module la production de mycotoxines. Il y a compétition entre différents champignons. Le taux d'AF est souvent moins important lorsqu'*A. parasiticus* est introduit dans le milieu de culture en même temps qu'*A. flavus*. Le même phénomène est observé lorsque la souche introduite simultanément est une souche non-toxinogène. Le rapport AFB1 /AFG1 est modifié, même si globalement la quantité totale est identique. La présence de *F. moniliforme* dans les épis de maïs protège celui-ci d'une contamination par *A. flavus* et réduit le taux d'AF produit. *F. moniliforme* protège aussi contre la contamination par *F. graminearum*. Mislivec *et al.* (1988) montrent que lorsqu'*A. parasiticus* ou *A. ochraceus* poussent en même temps que *A. flavus*, il n'y a pas diminution de la production d'AF. En revanche, la présence de *Penicillia* diminue significativement le taux d'AF. L'inhibition de la production d'AF par *A. flavus* lorsqu'*A. niger* est présent, est due à la synthèse par ce dernier d'un produit inhibant la biosynthèse d'AF. L'OTA à faible concentration (< 0,5 mg/l) n'a d'effet ni sur la croissance d'*A. parasiticus*, ni sur la production d'AF, par contre

à forte concentration ($> 2,5$ mg/l), la synthèse d'AF est stimulée. On avance l'hypothèse que l'OTA augmente la production d'AF, parce que, comme l'OTA découple la phosphorylation oxydative, il y a accumulation d'entité acétate, nécessaire à la biosynthèse d'AF.

Quand *A. parasiticus* croît en présence de *Streptococcus lactis* ou *Lactobacillus casei*, la quantité d'AF diminue. Ceci se produit quand la contamination par les deux agents est séquentielle, en revanche si la contamination débute au même instant, on note une amplification de la production d'AF (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

La présence de plusieurs espèces fongiques sur la même denrée a généralement un effet inhibiteur 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.

4. Mycotoxines et toxinogénèse

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires, de faible poids moléculaire, présentes dans plusieurs produits de l'alimentation humaine et animale et qui provoquent de nombreuses maladies chez l'homme et l'animal (Mayer, 1953; Coker, 1997). Plusieurs milliers de molécules toxiques ont été identifiées chez les champignons mais seule une vingtaine de familles posent des problèmes en nutrition humaine ou animale (Cahagnier *et al.*, 1998). L'origine chimique des mycotoxines est très diverse certaines dérivent, des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, slaframine, gliotoxine, roquefortine, sporodesmine), des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxine, patuline, citrinine, acide pénicillique, stérigmatocystine, zéaralénone), des dérivés terpéniques (diacétoxyscirpénol, fusarénone, désoxynivalénol, roridines, toxine T-2, verrucarine) ou encore des dérivés d'acides gras (fumonisines, alternariol) (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Les mycotoxines sont produites dans les matières alimentaires, leur décontamination est très difficile. Ces molécules ne sont pas détruites au cours

d'un stockage prolongé et sont souvent résistantes aux traitements thermiques ou chimiques (Langseth *et al.*, 1993 ; Cahagnier *et al.*, 1998).

La contamination des moisissures sur les aliments ne signifie pas obligatoirement la présence de mycotoxines. La production des mycotoxines peut s'effectuer depuis le champ jusqu'à l'assiette. Cependant, le type de mycotoxines contaminant les aliments ainsi que la quantité de mycotoxine produite dépendent de plusieurs éléments comme les espèces fongiques, les conditions écologiques dans lesquelles les champignons se développent. Il dépend également de la stabilité de ces toxines dans le milieu alimentaire.

Les céréales (maïs, manioc, riz) consommées dans les régions tropicales sont souvent contaminées par des mycotoxines produites par des moisissures du genre *Aspergillus* ou *Penicillium*. Parmi les mycotoxines connues, les AFs sont des substances hautement toxiques car elles sont cancérogènes et tératogènes, provoquant des cancers hépatiques et extra hépatiques humains (IARC, 1993; Massey *et al.*, 1995; Castegnaro & Pfohl-Leskowicz, 1999; Hussein *et al.*, 2001; INSPQ, 2002). L'OTA et la CIT sont produites par les *Aspergilli* (*Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*) ou *Penicillia* (*Penicillium viridicatum*, *P. verrucosum*, et *P. cyclopium*). Il a été rapporté que l'OTA est hautement cancérogène pour le rein et tératogène (IARC, 1993 ; Pfohl-Leskowicz et Castegnaro, 1999 ; Manderville & Pfohl-Leskowicz, 2006 ; Pfohl-Leskowicz & Manderville, 2007). Plusieurs études ont démontré l'implication de l'OTA dans certaines néphropathies épidémiques à l'homme et à l'animal (Pfohl-Leskowicz *et al.*, 2002, Bennett *et al.*, 2003, Castegnaro *et al.*, 2006). Il en est de même, pour la CIT. (Arai et Hubino, 1983; NTP, 1989, Pfohl-Leskowicz *et al.*, 2007). De plus, la CIT amplifie l'effet cancérogène induit par l'OTA (Kanizawa, 1984)

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à trois mycotoxines l'aflatoxine B1 (AFB1), la citrinine (CIT) et l'ochratoxine A (OTA).

4.1. Aflatoxine (AF)

C'est en 1960 que, pour la première fois, a été établie la relation entre une intoxication dans un élevage de dindons et la présence d'une moisissure (*Aspergillus flavus*) parasitant les arachides. Ce sont les Anglais qui ont isolé une des molécules responsables, l'AF (Adams *et al.* 2002 ; Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005).

La pénétration dans l'organisme de l'AF peut avoir lieu par voie orale et trachéale. L'absorption est rapide et s'effectue au niveau de l'intestin grêle dans la partie duodénale. L'AFB1 rejoint le foie par la veine porte. La distribution à partir du plasma dans les hépatocytes est réalisée par diffusion passive à travers les membranes. Une partie de l'AFB1 est éliminée dans la bile après biotransformation sous forme conjuguée au glutathion, à l'acide glucuronique et au sulfate. Cette excrétion biliaire représente environ 50% de la dose excrétée chez la plupart des espèces animales. 15% à 25% de la dose ingérée sont éliminés par la voie urinaire sans transformation ou sous forme de dérivés conjugués. Ceci est dû, entre autre, au fait que l'AFB1, au niveau du plasma, se fixe sur l'albumine sur le même site que la phénylbutazone (Castegnaro *et al.*, 1999)

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 que la chèvre, le mouton, le rat et la souris. L'AFB1 provoque une hépatotoxicité, elle est tératogène, et immunotoxique. Pour être toxique ou mutagène, l'AFB1 doit être métabolisée. Elle est transformée en plusieurs métabolites comme décrit dans la figure 2 (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Pour l'homme, les suggestions d'une relation entre des nourritures fortement contaminées en AFs et certaines maladies sont plus récentes. Les intoxications aiguës, potentiellement liées à des consommations d'AFs, ont été répertoriées par Hall&Wild (1994) et Wild & Hall (1996).

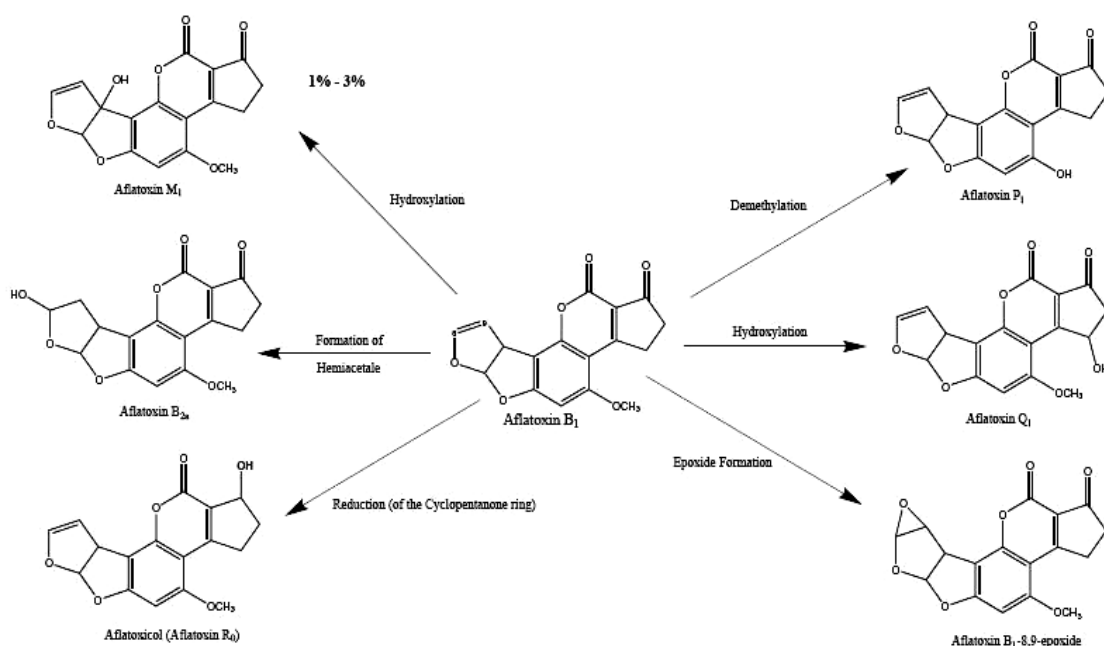


Figure 2 : Voie métabolique d'AFB1

En 1971, on a prouvé l'activité cancérigène des AFs chez l'animal. En 1987, les AFs ont été classées dans le groupe I (produits cancérigènes pour l'homme) par l'IARC (Castegnaro, 1999). L'interaction ADN-toxine est le point clef dans le développement du processus de cancérogénese. Sur la figure 3 sont présentés des adduits d'AF sur l'ADN (Pfohl-Leskowicz, 1999).

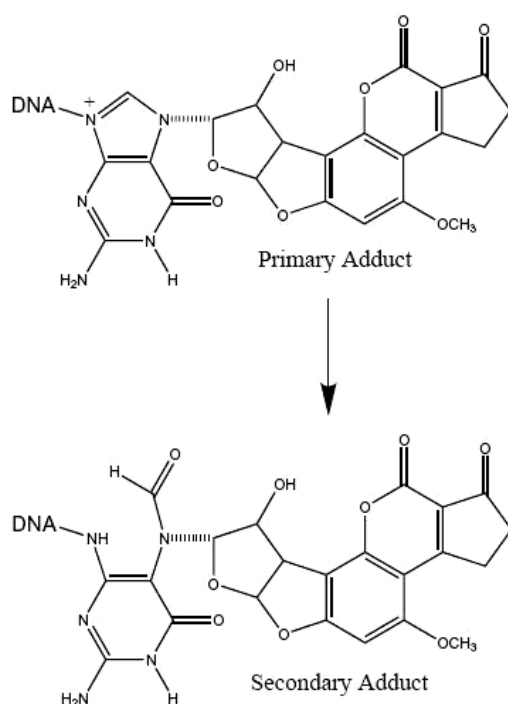


Figure 3 : Adduit à l'ADN d'Aflatoxine B1.

D'après Wild et al. (1992), une ingestion de 1,4µg d'AFB1 associée au virus d'hépatite B constitue un risque de développement de cancer ; le mécanisme de cette interaction est présenté dans la figure 4 (Moss, 2002)

L'AF est produite par trois souches d'*Aspergillii* connues. Ce sont *A. flavus*, *A. parasiticus*, et *A. nomius*. La voie de biosynthèse des AFs est présentée dans la figure 5. Les structures chimiques de certaines AFs sont présentées dans la figure 6 (Cole *et al.*, 2003a). Comme beaucoup de métabolites secondaires, les AFs sont une famille de composés relativement proches, le plus abondant et le plus toxique est l'AFB1 (Adams *et al.* 2002).

Les propriétés physiques des AFs sont présentées dans le tableau 3 (Cole *et al.*, 2003a).

Les AFs, à l'état sec, sont très stables à la chaleur jusqu'au point de fusion. Cependant, en présence d'eau et à température élevée, il y a une destruction de l'AF en fonction du temps. Une telle destruction de l'AF peut se produire dans les farines de graines oléagineuses, dans une solution aqueuse à pH 7. Bien que les produits de réaction n'aient pas été examinés en détail, il semble probablement qu'un tel traitement provoque l'ouverture du cycle lactone avec possibilité de décarboxylation aux températures élevées (Castegnaro *et al.*, 2006).

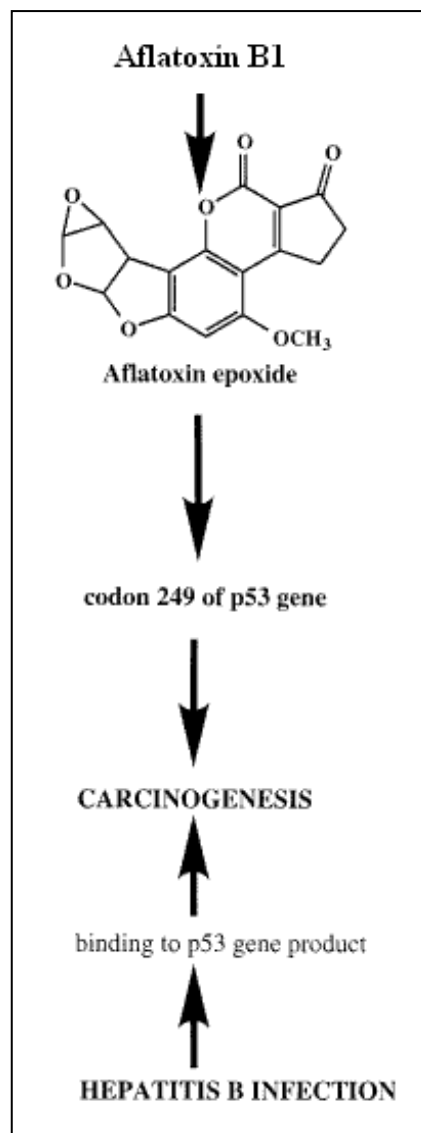


Figure 4 : Interaction entre AFB1 et virus d'hépatite B

Bien que les produits permettant l'extraction des AFs semblent être des composés relativement stables, ils contiennent un certain nombre de groupes fonctionnels qui peuvent poser des problèmes de stabilité. Les résidus alcalins sur la verrerie ou les adsorbants (créant un pH >10) peuvent entraîner l'ouverture de la lactone de la coumarine peut avoir lieu, ayant pour résultat la formation de phénolate et de carboxylate de sodium, susceptible respectivement de changements et de décarboxylation oxydative. L'aflatoxine pure, en solution standard ou après purification, est plus sensible à des modifications que les aflatoxines protégées par les composants d'un extrait (Andrellos *et al.*, 1967).

Les combinaisons de solvants et d'irradiation, susceptibles d'engendrer une décarboxylation, ont produit jusqu'à quatre nouveaux dérivés de dégradation fluorescents. L'AFB1 ne subit pas de dégradation solaire en absence d'humidité. L'acidité augmente la dégradation solaire (Samarajeewa *et al.*, 1988).

En solution alcaline, on observe une hydrolyse de la lactone. Cette hydrolyse paraît être réversible puisqu'une acidification permet de retrouver de l'AF. En présence d'acides minéraux, l'AFB1 et l'AFG1 sont converties en AFB2A et AFG2A correspondant à l'addition de l'eau sur la double liaison dans le cycle de furane (Figure 6).

Tableau 3 : Propriétés physiques des aflatoxines

Aflatoxine	Formule moléculaire	Masse moléculaire	Point de fusion
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293
B _{2A}	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	240
G _{2A}	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	346	190

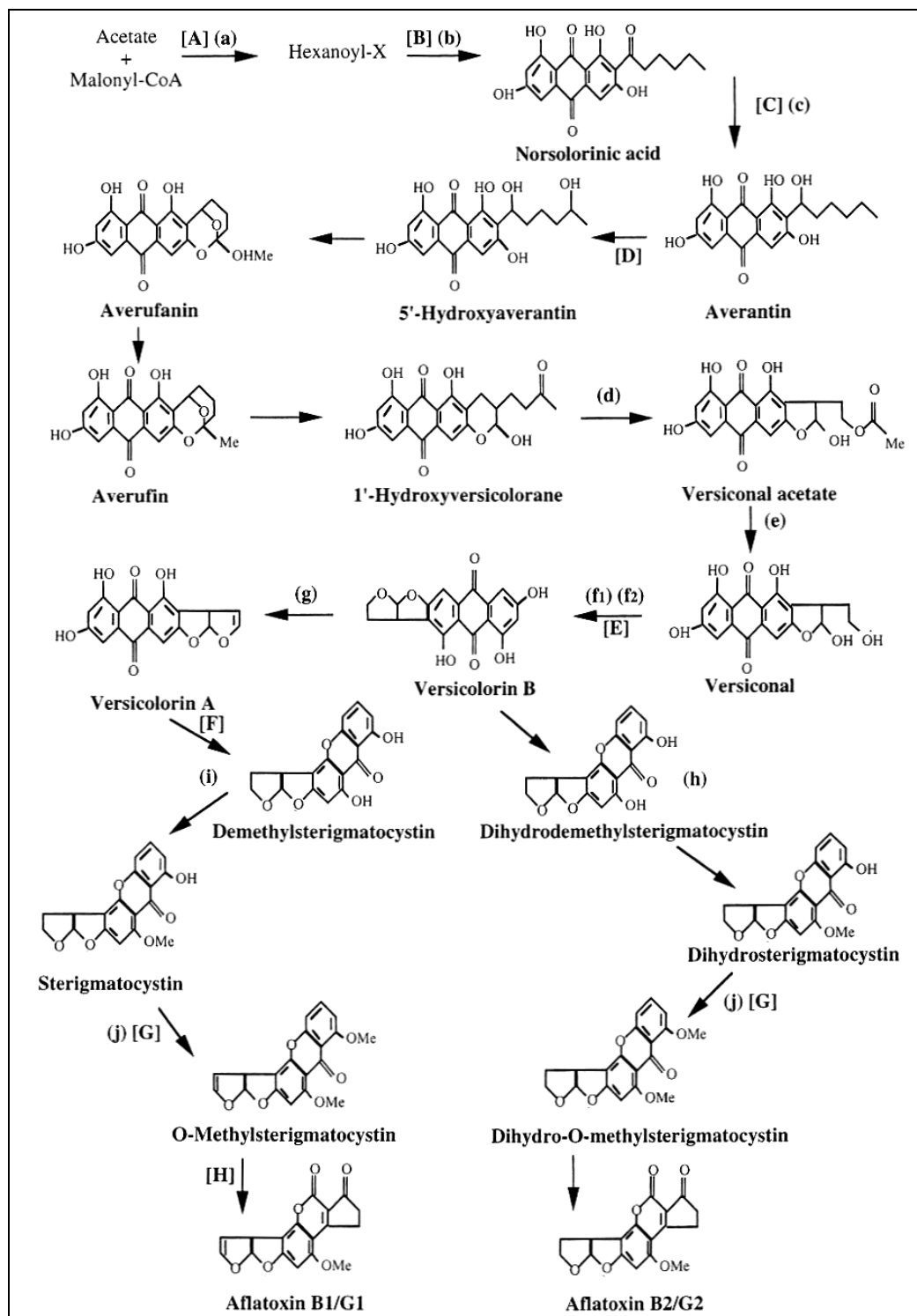


Figure 5 : Voies de biosynthèses des AFs.

Les enzymes impliqués sont : (a) synthétase d'acide gras, (b) synthétase de polycétide, (c) réductase d'acide norsolorininc, (d) réductase d'acétate d'hémi-acétal de versiconal, (e) estérase, (f) synthétase du versicolorin B, (f) cyclase de versiconyl, (g) désaturase, (h) 1,2 O-méthyltransferase (MT-II), (i) O-méthyltransferase, (j) O-méthyltransferase (MT-I) (Sweeney *et al.*, 1998).

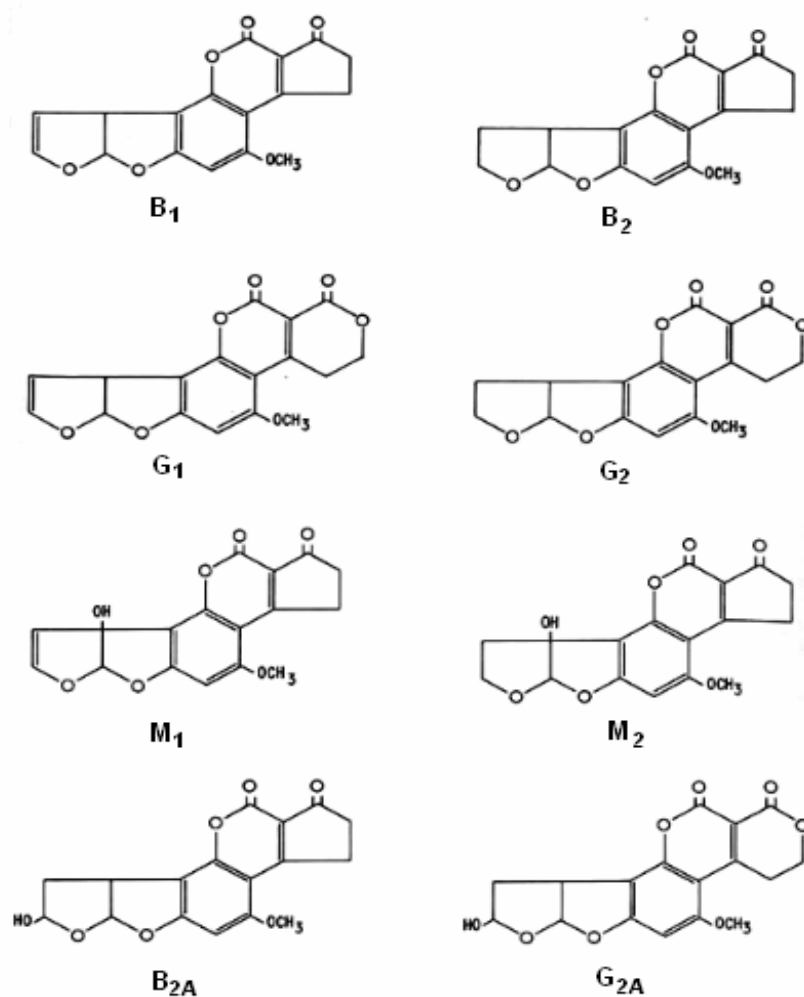


Figure 6 : Structures chimiques des aflatoxines

Plusieurs agents oxydants, comme l'hypochlorite de sodium, le permanganate de potassium, le chlore, le peroxyde d'hydrogène, l'ozone ... réagissent avec l'AF et changent cette molécule comme indiqué par la perte de la fluorescence. Les mécanismes de ces réactions sont incertains et les produits de réaction ne sont pas identifiés dans la plupart de cas (Reddy et Farid Waliyar).

4.2. Citrinine

La Citrinine (CIT) a été décrite en 1931 comme pouvant être utilisée comme un antibiotique, mais finalement rejetée à cause de sa toxicité (Adams *et al.*, 2002).

La CIT est un métabolite secondaire toxique, tout d'abord isolé de *P. citrinum* (Hetherington, 1931). Elle est aussi produite par d'autres espèces de *Penicillium* (Ei-Banna *et al.*, 1987), d'*Aspergillus* (Kurata, 1990) et de *Monascus* (Blanc *et al.*, 1995a, 1995b).

La contamination par la CIT est observée dans divers aliments à base de céréales (maïs, blé, orge, riz, fruits, produits de céréales...) (Janardhana *et al.*, 1999 ; Comerio *et al.*, 1998 ; Abramson *et al.*, 1999 ; Aziz, 2002 ; Meister, 2004).

Caractères physico-chimiques :

La Citrinine [C₁₃H₁₄O₅ : acide 4,6-dihydro- 8-hydroxy- 3,4,5- tri méthyle- 6-oxo -3H-2-benzopyran- 7 carboxylique] est un composé acide jaune- citron dont l'absorption son spectre varie entre à 250 nm et 333 nm (dans le méthanol). Son point de fusion est à 172°C. Elle est peu soluble dans l'eau, mais soluble dans des solutions d'hydroxyde de sodium, carbonate de sodium, ou acétate de sodium ; dans le méthanol, l'acétonitrile, l'éthanol et la plupart des solvants organiques polaires (Deshpande, 2002). Elle peut former les complexes 'chélate', être dégradée en solution acide ou alcaline ou par la chaleur. C'est une méthide de quinone avec deux ponts hydrogènes intra-moléculaire. La CIT cristallisée sous deux formes tautomeriques *p*-quinone et *o*-quinone (Figure 7). Dans le méthanol ou un mélange de méthanol / chlorure de méthylène, la CIT subit une réaction d'addition nucléophile (Poupko *et al.*, 1997).

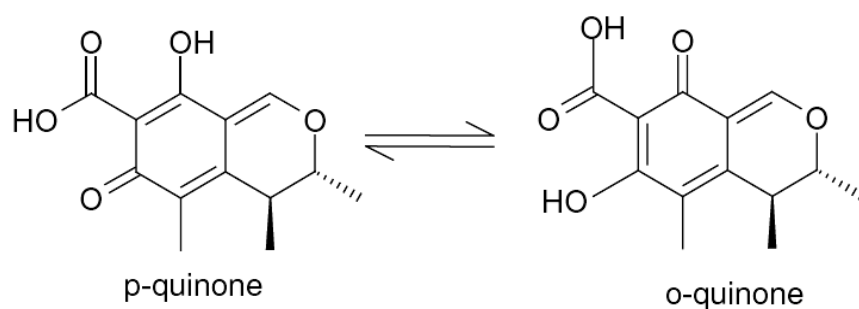


Figure 7 : Les structures isomériques de la CIT.

4.3. Ochratoxine A

L'ochratoxine A (OTA) a été découverte pour la première fois chez *A. ochraceus* (Van der Merwe *et al.*, 1965). Elle est produite par deux genres fongiques : *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*, etc.) et *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. nordicum*, etc.). Le genre *Aspergillus* est bien adapté pour les climats chauds alors que *Penicillium* se développe bien dans les climats tempérés. C'est pour cette raison que la présence d'OTA a été détectée dans de nombreux produits agricoles de différentes régions du monde (Smith *et al.*, 1994). Par exemple l'OTA et ses champignons producteurs ont été trouvés dans les céréales et les produits dérivés, le café, le raisin, etc (Frisvad et Viuf, 1986 ; Pohland *et al.*, 1992, pour une revue voir Jorgensen, 2005).

La structure chimique de l'OTA est montrée dans la figure 7. Elle s'agit de 7-carboxy-5-chloro-8-hydroxy-3,4dihydro-3R-méthylisocoumarine-7-L- β -phénylalanine. Il existe d'autres ochratoxines comme l'OTB qui est le dérivé non chloré de l'OTA et l'OTC qui est son ester éthylique. Structuellement les trois ochratoxines diffèrent très légèrement les unes des autres, cependant ces différences ont des effets marqués sur leur potentiel toxique respectif. L'OTA est la plus répandue. Elle est plus toxique que l'OTB, mais moins que l'OTC. Leurs structures sont présentées dans la figure 8 (Cole *et al.*, 2003b).

L'OTA est un solide blanc de masse molaire 403,08 g/mole, ayant un point de fusion de 169°C lorsqu'elle est cristallisée dans du xylène ; et 94-96°C dans le benzène. Son spectre d'absorption UV varie avec le pH et la polarité du solvant. L'OTA possède un maximum d'absorption à 333 nm avec un coefficient d'extinction molaire de 6400 mol⁻¹.cm⁻¹ dans le méthanol. Dans les mêmes conditions, ce coefficient est de 7000 pour l'OTC. L'OTB absorbe à 318 nm et a un coefficient d'extinction de 6900 (Cole *et al.*, 2003b). L'OTA est partiellement dégradée dans des conditions normales de cuisson (Müller, 1982), mais peut aussi être transformée en 3-S-OTA (Bruinink *et al.*, 1997). Elle est complètement dégradée par un traitement à l'hypochlorite de sodium 4% (Castegnaro *et al.*, 1991).

L'OTA est toxique pour l'homme et l'animal. Elle est potentiellement néphrotoxique chez toutes les espèces testées, à l'exception des ruminants adultes. L'OTA est considérée comme un cancérogène rénal au moins lors d'une exposition à long terme. Elle a été classée dans le groupe 2B « cancérogène possible pour l'homme » par l'IARC (International Agency for Research on Cancer). L'OTA est un cancérogène formant des adduits à l'ADN suite à la formation de quinone (Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 2005, Tozlovanu *et al.*, 2006, Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007). Cette mycotoxine est tératogène chez l'animal. Elle provoque, par exemple, des anomalies morphologiques diverses chez le rat, la souris, le hamster, le porc et l'embryon de poulet. L'OTA affecte l'immunité cellulaire et humorale. Les différents tests sur les procaryotes pour évaluer la mutagénicité de l'OTA ont tous conduit à des résultats, soit faiblement positifs, soit négatifs. Par contre elle est mutagène et génotoxique dans des tests effectués sur mammifères (pour un revue récente voir Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007). Les normes d'OTA tolérées par les pays européens dans les produits alimentaires ont été fixées à 3 µg/kg dans les céréales transformés, 5 µg/kg dans les céréales brutes, 5 µg/kg dans les grains de café, 2 µg/l dans le vin et le jus de raisin (Olsen *et al.*, 2003, Règlement (CE) N° 1881/2006)

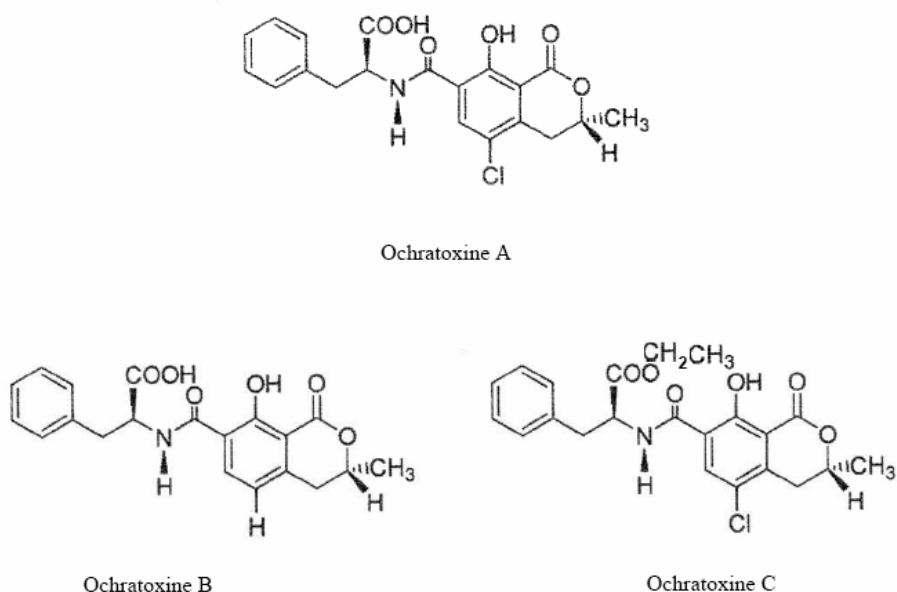


Figure 8 : Structure chimique des ochratoxines A, B et C.

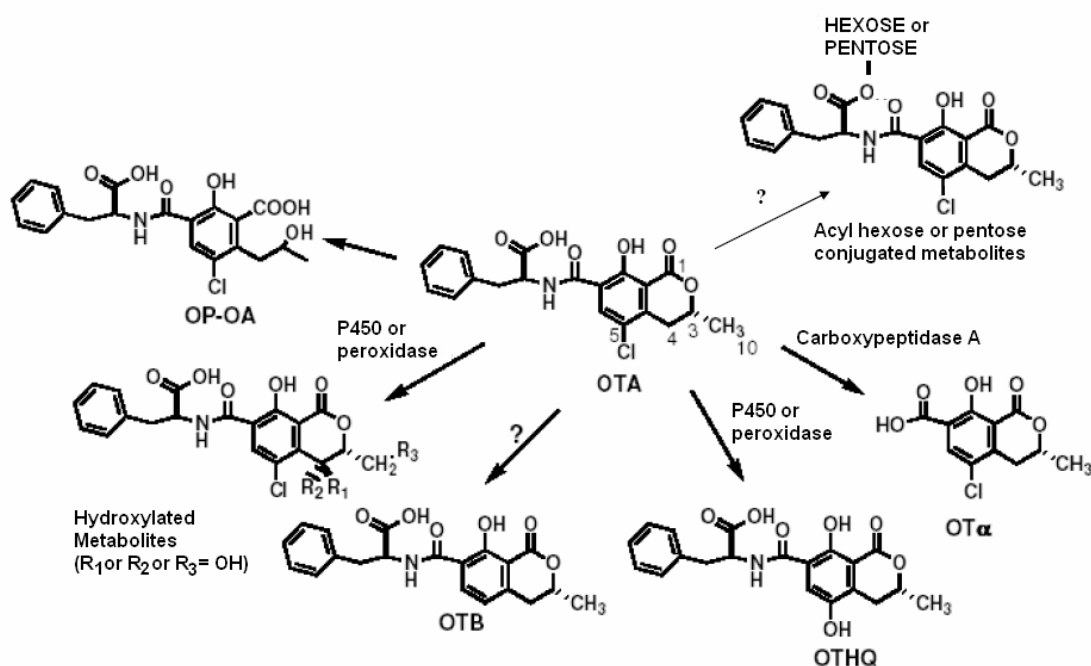


Figure 9 : Dérivés métaboliques de l'OTA
(d'après Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2006).

Au Danemark, sévissent encore aujourd'hui des épidémies sporadiques de néphropathies porcines, vraisemblablement dues à l'OTA et à une synergie d'action avec une autre mycotoxine, la CIT se développant sur les mêmes substrats (blé, maïs). Il existe également une maladie chronique rénale humaine, évoluant lentement vers la mort, localisée dans les Balkans (Roumanie, Bulgarie, Croatie... le long du Danube et de ses affluents), provoquant chez les populations atteintes une anémie, une diminution de la taille des reins avec une dégénérescence des tubules proximaux. Il s'agit d'une maladie à caractère familial (10% des habitants de certains villages) affectant surtout les femmes de 30 à 50 ans et dont l'étiologie reste inconnue actuellement, malgré d'importantes recherches financées par l'OMS dans les années 80 (investigations sur virus, métaux lourds, facteurs génétiques) (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2002 ; Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005).

5. Caractéristiques des espèces productrices de trois mycotoxines de stockage

Dans cette étude, nous nous concentrerons sur l'AFB1, la CIT et l'OTA. Les principaux producteurs de ces mycotoxines sont les *Aspergillii* et les *Penicillia*.

5.1. *Aspergillus* et téléomorphes relatifs.

(Pitt *et al.*, 1977 ; Cahagnier *et al.*, 1998)

Pouvant se développer à température élevée ou lorsque l'activité de l'eau est réduite, les espèce d'*Aspergillus* et sa téléomorphe *Eurotium* sont de parfaites moisissures de détérioration. *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* sont les moisissures dominantes de la flore moisie.

Aspergillus fait partie des *Deuteromycetes* (champignons imparfaits, reproduction asexuelle), ordre des *Hyphomycetes*, famille des *Moniliaceae* qui sont caractérisés par la formation de conidiophores avec des grandes stipes, sa paroi épaisse et le bout de stipe gonflé appelé vésicules. Les vésicules sont souvent sphériques et rugueuses, parfois sont étirées ou gonflées dans quelques cas, elles sont moins apparentes. Les vésicules portent les métules et les phialides ou uniquement les phialides, tous les deux sont produits simultanément. Deux autres traits de caractère sont utiles pour l'identification de la plupart des espèces d'*Aspergillus*, d'une part les stipes formés d'une cellule courte appelée « footcell » avec un hyphe fertile, d'autre part, les stipes souvent non cloisonnés. (Figure 10)

Téléomorphes

Ils sont classifiés en au moins huit genres d'Ascomycètes. Trois d'entre eux sont très présents dans les aliments : *Eurotium*, *Neosartorya*, ou *Emericella*.

Les espèces d'*Eurotium* sont caractérisées par la présence de cléistothèces, petites boules jaunes d'or visible à l'œil nu. Les têtes produisant les conidies sont formées de phialides seuls. Sur malt agar (MA), les colonies sont vertes et jaunes. Les cléistothèces, obtenus plus rapidement sur milieu sucré, sont dispersés dans le mycélium qui porte les têtes d'*Aspergillus*. Les *Eurotium* sont

typiquement des organismes xérophiles (La définition de la xérophilie selon Pitt (1975) est celle qui a la capacité à croître à une a_w inférieure à 0,85), ils croissent plus vigoureusement sur le milieu G25N (Nitrate Glycerol 25% Agar) que sur le milieu CYA (Czapek Yeast Extract Agar) et MEA (Malt Extract Agar).

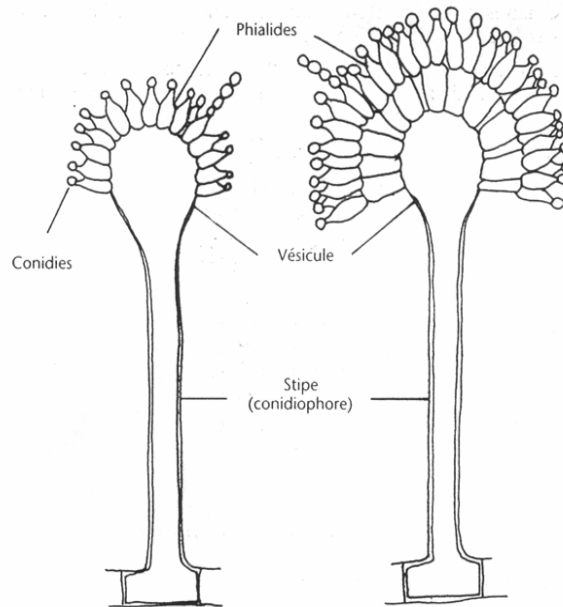


Figure 10 : Caractères morphologiques des *Aspergillus*
(D'après Samson *et al.*, 1981)

Les espèces de *Neosartorya* produisent aussi des têtes de phialides seuls, mais ses cléistothèces sont blancs et les ascospores sont incolores. Les colonies croissent rapidement sur les milieux de CYA et MEA à 25° et 37°C. Ils ne sont pas xérophytiques.

Les espèces d'*Emericella* produisent des têtes avec doubles métules et phialides, et cléistothèces blancs produisant des ascospores rouges ou pourpres. Les cléistothèces sont entourés par les cellules de Hulle qui sont sphériques et rugueuses ressemblant à des chlamydoconidia.

Description de quelques espèces d'*Aspergillus* importantes dans cette étude.

Aspergillus parasiticus

A 25°C, sur le milieu CYA, le diamètre de la colonie est de 50 à 70 mm. Elle est plate, basse, dense et veloutée ; le mycélium est blanc ; les têtes des

conidies sont dans une couche dense, uniforme, vert jaune foncée. Elle produit, de temps en temps, des sclérotés ; le revers est incolore ou brun. Sur MEA, le diamètre des colonies est de 50 à 65 mm, la colonie est généralement semblable à celle sur CYA, mais souvent moins dense et le revers incolore. Sur G25N, la colonie est de 20 à 40 mm de diamètre; elle est plate, basse, et veloutée. La colonie est généralement semblable à celle sur CYA ; le revers est incolore, jaune ou brun (Figure 11). Elle ne se développe pas à 5°C.



Figure 11 : Colonie d'*Aspergillus parasiticus* sur CYA, MEA, G25N (de gauche à droite) à 25°C après 7 jours

À 37°C, la colonie couvre toute la zone disponible ; elle est semblable à celle sur CYA à 25°C, ou la colonie est verte foncée ou brune claire, et le revers pâle.



Figure 12 : Colonie d'*Aspergillus parasiticus* sur AFPA à 30°C, après 3 jours.
colonie (gauche) ; son revers (droite)

Les sclérotés sont parfois produits, ils sont sphériques, de diamètre de 400 à 800µm, blancs au début puis devenant noirs. Les conidiophores sont produits d'hyphes de surface ou en profondeur.

Caractères distinctifs :

Aspergillus flavus et *A. parasiticus* ont en commun une croissance rapide aux deux températures 25 et 37°C, et la couleur de leurs conidies est vert-jaune clair. La forme des conidies permet de différencier les deux espèces sans ambiguïté. *A. flavus* produit des conidies de forme et taille variable, dont la paroi est relativement mince, pouvant être lisse ou légèrement rugueuse. Au contraire, les conidies d'*A. parasiticus* sont sphériques et ont la paroi épaisse et rugueuse. D'autre part, les vésicules d'*A. flavus* sont plus grandes, avec un diamètre allant jusqu'à 50 µm. Elles portent souvent des métules, tandis que les vésicules d'*A. parasiticus* ne dépassent que rarement 30 µm de diamètre et des métules peu fréquentes.

Physiologie

Il semble maintenant clair que les deux espèces *A. flavus* et *A. parasiticus* soient physiologiquement très semblables. La croissance d'*A. parasiticus* se produit entre 12-42°C, avec une température optimale à 32°C. Une a_w minimale pour la croissance est de 0,82 à 25°C, de 0,81 à 30°C et de 0,80 à 37°C, semblable à celle d'*A. flavus*. La croissance d'*A. parasiticus* a lieu entre pH 2,4-10,5 à 25, à 30 et à 37°C. Il n'y a pas de croissance à pH 2,2 et à 25°C. Les taux élevés d'acide sorbique (1000mg/kg) sont nécessaires pour empêcher la croissance d'*A. parasiticus* sur des milieux synthétiques à pH 5.

Les conidies d'*A. parasiticus* ont une grande résistance à basse température. Des valeurs D (temps pour diminuer d'un logarithme de nombre de microorganismes) à 55°C, pH 7, de 9 minutes dans la solution tampon de phosphate ont été rapportées. Cependant les valeurs étaient beaucoup plus importantes si l' a_w était réduite : 230 minutes à 55°C en présence de 16% NaCl

(l' a_w de 0,90), 210 minutes en glucose de 60% (l' a_w de 0,85) et 200 minutes en sucrose à 60% (l' a_w de 0,90).

Selon Northolt (1976), le facteur le plus important pour la croissance de mycélium est la température ; par contre, pour la production d'aflatoxine, c'est l' a_w . Une faible croissance est possible à une a_w faible, mais la production d'aflatoxine n'est pas démontrée.

Aspergillus niger

Sur CYA, la colonie a un le diamètre de 60mm ou plus, envahit souvent toute la surface de la boîte de Pétri. Elle est plate, duveteuse, avec un mycélium blanc et des têtes de conidies noires. Le fond de la boîte de Pétri est souvent pâle, voire jaune clair (Figure 13) (Pitt *et al.*, 1997).

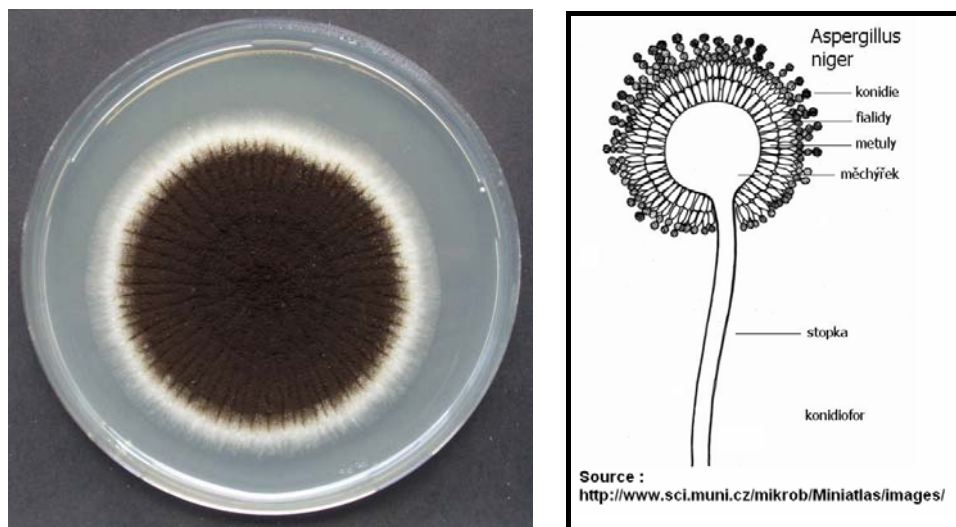


Figure 13 : Colonie d'*A. niger* sur CYA à 25°C , après 7 jours (gauche) ;
la tête (droite).

Sur MA, les colonies sont de 30-60 mm de diamètre, souvent plus petites que celles sur CYA et assez éparées; les autres caractères sont semblables.

Les colonies sur G25N sont de 18-30 mm de diamètre, plates, veloutées, avec une bordure mycélienne blanche ou jaune claire ; les autres caractères sont

semblables à celles sur CYA ; le revers est pâle ou parfois avec des aires brunes foncées.

A 5°C, *A. niger* ne pousse pas sur CYA.

A 37°C, sur CYA, les colonies ont un diamètre de 60mm ou plus, envahissent l'espace disponible avec parfois des sillons ; les autres caractères sont semblables à celles sur CYA à 25°C.

Les conidiophores ont produits des hyphes de surface, de 1,0 à 3,0 mm de long, avec la paroi lisse, transparente ; bisériées avec des métules-phialides tout autour d'une vésicule ronde, de 50-70 µm de diamètre ; les métules sont de 10-15 µm de long, ou parfois plus ; les phialides sont de 7-10 µm de long ; les conidies, sphériques, de 4-5 µm de diamètre, brunes, rugueuses, parfois côtelées.

Mycotoxines

A. niger est considérée comme une moisissure non dangereuse, c'est pourquoi elle est communément utilisée dans le processus alimentaire. Elle est généralement classée inoffensive par le Gouvernement des Etats Unis (Pitt *et al.*, 1997). Pourtant, *A. niger* peut produire l'OTA, par exemple deux des 19 souches isolées à partir de fourrage ; 35 souches d'*A. niger* (11,5%) isolées à partir de café brésilien brut et 27 des 36 souches isolées d'olives du Maroc ont produit de l'OTA (Abarca *et al.*, 1994 ; Urbano *et al.*, 2001 ; Sevastianos *et al.*, 2006).

Physiologie

Les températures minimales de croissance pour *A. niger* sont 6-8°C, les maximales, 45-47°C, et les optimales, 35-37°C. *A. niger* est xérophile : la germination se produit à l' a_w de 0,77 à 35°C. Entre pH 4,0 et 6,5, les variations de croissance sur les milieux NaCl ou glycérol sont minimales. *A. niger* peut se développer à un pH aussi bas que 2,0 si l' a_w est élevée.

Aspergillus versicolor

Sur le CYA, la colonie a un diamètre de 16-25 mm, plate, dense avec des sillons plus ou moins profonds ; le mycélium est blanc à chamois ou orange ;

avec des conidies éparses à assez denses, gris-verdâtre à vert-grisâtre ; l'exsudat, qui peut exister parfois, est rose à rouge vin ; le revers est orange- brunâtre à brun- rougeâtre. (Figure 14)

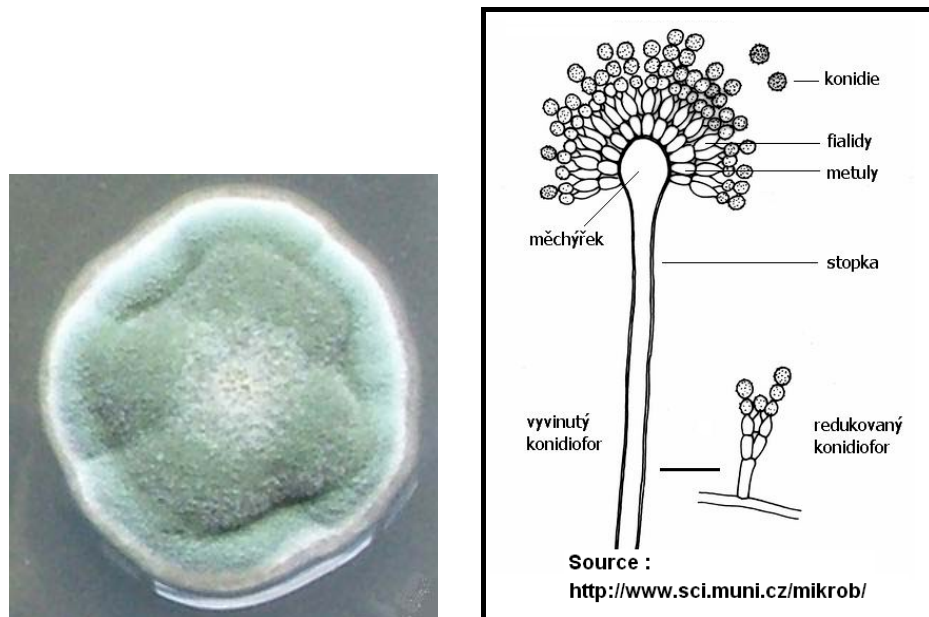


Figure 14 : Colonie d'*Aspergillus versicolor* sur CYA à 25°C, après 7 jours.
colonie (gauche) ; la tête (droite)

A 25°C, sur le MEA, la colonie, de diamètre de 12-25 mm, est basse, plate et dense, habituellement veloutée ; le mycélium blanc à chamois ; les nombreuses têtes des conidies rayonnent du presque vert au vert de cactus. Le revers est jaune brun au brun orange. Les colonies, sur G25N, font de 10 à 18 mm de diamètre, plates ou bombées au centre, denses ; mycélium blanc, chamois ou jaune ; le revers est pâle, brun jaunâtre ou brun orangé.

Aucune croissance à 5°C. Habituellement, aucune croissance non plus à 37°C. Cependant, certaines colonies peuvent se former et atteindre jusqu'à 10mm de diamètre.

Les conidiophores sont soutenus par des hyphes de surface ou aériens ; les stipes ont une longueur de 300-600 μm , avec les parois jaune foncé ; les vésicules ont des tailles variables, les plus grandes sont presque sphériques, de 12 à 16 μm de diamètre, elles sont fertiles de la moitié aux deux tiers de la surface de la vésicule ; les plus petites, à peine gonflées, soutiennent des métules et des

phialides étroitement enlacées, de 5 à 8µm de long ; la plupart des conidies sont sphériques, très petites, 2,0-2,5 µm de diamètre, avec des parois rugueuses.

Caractères distinctifs

A. versicolor se développe lentement, produit des métules et des phialides à partir de petites vésicules, et des conidies vertes. La croissance, à 37°C, est faible ou absente. Cette espèce se remarque par la large rangée de pigmentation du mycélium et du revers, particulièrement si l'incubation des cultures a lieu pendant 14 jours ou plus.

Mycotoxines

A. versicolor est le producteur principal de la stérigmatocystine, un précurseur des AFs. La toxicité orale aiguë est peu importante car elle est peu hydrosoluble, ainsi la stérigmatocystine est peu susceptible d'être responsable des manifestations aiguës d'empoisonnement chez l'homme ou chez les animaux. En raison de cette insolubilité, la quantité de produit absorbé par les animaux est faible. L'absorption dépend du mode d'administration, si bien que la dose létale 50 (DL₅₀) s'échelonne entre 60 et 800mg/kg de poids corporel. Cependant, même des doses faibles peuvent occasionner des tumeurs et des changements pathologiques dans les foies des rats et des souris.

Bien que la stérigmatocystine possède une activité cancérigène moins importante que l'AFB1, elle n'en demeure pas moins un hépatocancérigène. Une dose chronique de 15µg/jour, absorbée sans interruption ou une dose aiguë de 10mg, entraîne un cancer du foie dans au moins 30% des rats mâles de la race Wistar.

Physiologie

A. versicolor est mésophile. La température minimale pour sa croissance est de 9°C à l'a_w de 0,973, la température maximale est de 39°C à l'a_w de 0,873, et l'optimale de 27°C à l'a_w de 0,98. La température maximale de croissance pour 20 isolats a oscillé entre de 32-39°C, la majorité étant proche de 35°C. L'a_w minimale de croissance est à 25°C de 0,78 ou 0,80. L'utilisation de NaCl ou de glycérol, pour contrôler l'activité de l'eau, affecte peu la croissance tant que le

pH est entre 4,0 ou 6,5. Si le pH est bas (inférieur à 3,1) la croissance est stoppée. A l'inverse à 25 et à 30°C, la croissance est identique pour des pH allant de 7,4 à 10,2.

La croissance d'*A. versicolor* est considérablement affectée par les atmosphères modifiées, la croissance diminue de moitié dès que la concentration en O₂ baisse à 5%, ou par addition de CO₂ (12-15%) pour des a_w de 0,98-0,90.

5.2. *Penicillium* et genres relatifs

Penicillia sont caractérisés par un filament dressé, le stipe, qui porte des cellules conidiogènes (phialides) groupées en pinceaux (d'où le nom de *Penicillium*), formant des conidies en chaînes. Entre les phialides et les stipes peuvent s'intercaler des éléments intermédiaires qui rendent l'organisation du pinceau plus complexe (Figure 15)

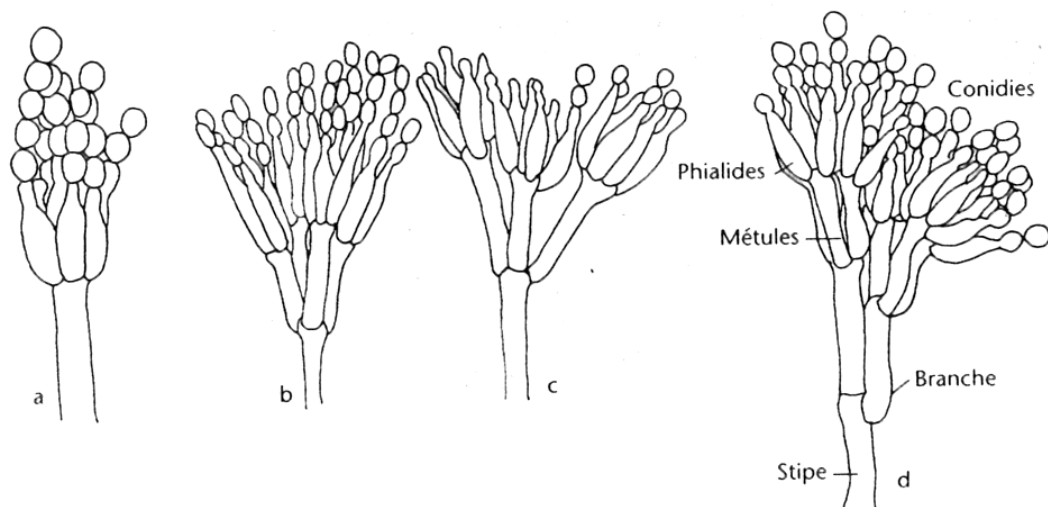


Figure 15 : Caractères morphologiques des *Penicillium* (a) Pinceau monoverticillé (b) biverticillé (c) biverticillé fourchu (furcatum) (d) terverticillé (D'après Raper et Thom, 1968 et Pitt 1979)

En générale, on distingue ainsi *P. monoverticillés*, les plus simples, les biverticillés où les cellules sporogènes sont portées par une rangée (verticille) de cellules intermédiaires (métules) et les terverticillés avec un troisième niveau de ramification. L'organisation des pinceaux permet de définir des groupes de

Penicillium à l'intérieur desquels la détermination spécifique est obtenue par des caractères microscopiques (formes, tailles et ornementsations) et physiologiques (couleur des colonies, pigments, vitesse de croissance sur différents milieux, à différentes températures) (Roquebert *et al.*,1998).

P. citrinum est l'espèce de *Penicillium* qui nous intéresse dans cette étude.

Penicillium citrinum

Caractères morphologiques

A 25°C, sur le milieu CYA, la colonie a un diamètre de 25-30 mm, avec des sillons radiaux, une texture veloutée à la périphérie du mycélium et floconneux au centre, et la présence d'une fine bordure. Le mycélium est blanc en périphérie et blanc à gris-orangé ou abricot au centre. La conidiogénèse est modérée. Le pigment soluble est jaune brillant quand il y en a. Le revers est jaune, jaune-brun, rouge-brun ou parfois olive.

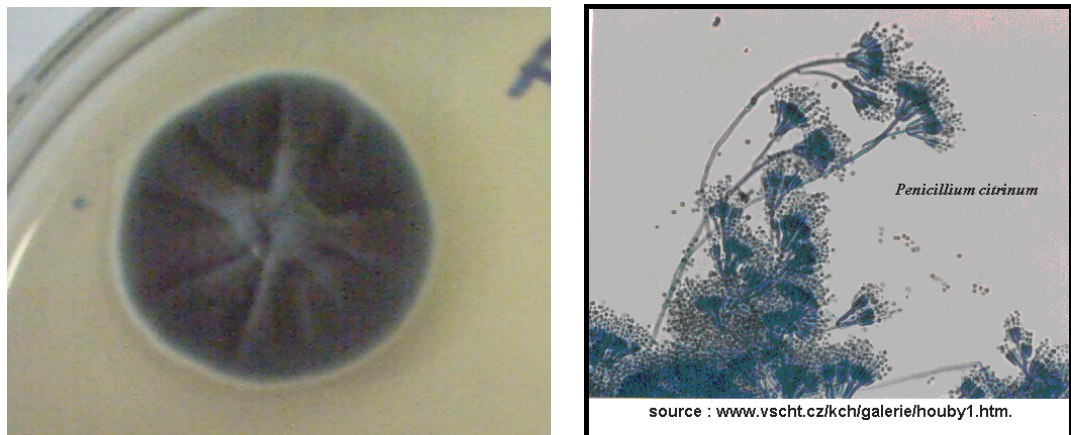


Figure 16 : Colonie de *P. citrinum* sur medium CYA (gauche) à 25°C, après 7 jours et les têtes de conidies (droite)

A 25°C, sur milieu MEA, la colonie, dense, a un diamètre de 14-18 mm, avec une texture lisse ou avec la présence de sillons radiaux modérément profonds ; parfois on a aussi une texture floconneuse avec un couvert mycélien blanc à gris-orangé ; une bordure très étroite et typiquement irrégulière ; une

conidiogénèse modérée à forte, gris-bleue en bordure ; absence de pigments solubles et d'exsudat ; le revers est brun pâle à jaune-brun foncé.

Sur G25N, le diamètre de la colonie est de 13-18 mm, veloutée et parfois floconneuse au centre avec des sillons radiaux et la présence d'un amas central ; le mycélium est blanc ; les conidies sont souvent abondantes, de couleur verte terne ; pas de pigments solubles ni d'exsudat ; le revers est pâle, brun terne, jaune brun ou parfois olive. Sur CYA, le diamètre de la colonie est environ de 10 mm à 37°C ; pas de germination à 5°C.

Les conidiophores produisent des hyphes en surface ou en profondeur, longs de 100-300 µm, de paroi lisse, ils se terminent en verticilles de 3-5 métules divergents de manière caractéristique. Les métules sont habituellement de longueur uniforme, généralement avec une vésicule en périphérie, les phialides, « ampouliformes », sont de 7-8(-12) µm de long. Les conidies sont sphériques ou sphéroïdes (2,2-3,0 µm de diamètre), avec des parois lisses ou finement rugueuses, sous forme de longues colonnes, une colonne par métule, ceux-ci disposés dans une spirale caractéristique sur chaque conidiophore.

Caractères distinctifs

P. citrinum est identifié par son penicilli, qui est composé de 3 à 5 métules vésiculeuses et divergentes, soutenant une colonne de conidies. Les colonies, sur CYA à 25°C, de couleur verdâtre, sont souvent dominées au centre par le jaune ou brun de l'exsudat. Sur MEA, la croissance de la colonie est plus lente mais habituellement dense, avec une grande production de conidies.

P. citrinum produit la CIT.

Physiologie

C'est une espèce mésophile, avec une température minimale de croissance aux alentours de 5°C. La température maximale est légèrement supérieure à 37°C, la température optimale étant située entre 26 et 30°C. À 25°C, l' a_w minimale de la croissance est de 0,80-0,84. *P. citrinum* peut se développer de pH 2 à 10.

6. Approches de décontamination

Les mycotoxines posent un problème important universel de santé publique, pour l'agriculture, et les sciences économiques. Le riz comme les autres aliments peu hydratés sont susceptibles d'être contaminés par des mycotoxines (Schmidt *et al.*, 1985). Pour pouvoir lutter contre les moisissures et les mycotoxines, il faut savoir à quel moment elles se développent. Ainsi, il est possible de définir six moments privilégiés au cours de l'élaboration d'un produit: lors de la culture, de la récolte, du stockage, de la transformation, de l'alimentation des animaux et enfin lors de la consommation par l'être humain (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Les moyens de lutte pour chaque période définie sont consignés dans le tableau 4 suivant et ne sont pas exhaustifs (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

La contamination fongique, son développement et la production de toxine peuvent se produire aux champs ou lors du stockage ou lors des deux périodes. Dans le cadre de cette thèse, nous nous concentrons exclusivement sur le problème du stockage.

Tableau 4 : Méthodes de lutte contre la contamination

Période définie	Solutions proposées :
Au champ	<ul style="list-style-type: none"> - créer des plantes résistantes - limiter le développement par l'emploi de fongicides - arrosage adapté - apport en minéraux
À la récolte	<ul style="list-style-type: none"> - veiller à la maturité du grain - inspection visuelle pour éliminer les éléments abîmés - éviter les récoltes par temps humide
Au stockage	<ul style="list-style-type: none"> - contrôle périodique - maintenir une bonne température - contrôler l'humidité - détruire les produits contaminés - une bone aération des silos.
À la transformation	<ul style="list-style-type: none"> - contrôle mais, plus au niveau des mycotoxines que des moisissures.
Dans l'alimentation des animaux	<ul style="list-style-type: none"> - tests de contamination, puis décontamination si nécessaire
À la consommation	<ul style="list-style-type: none"> - éliminer les aliments contaminés - jouer sur la cuisson

L'aliment doit être nutritif ; il en est riche en micro-organismes. En fonction des conditions physiques et chimiques spécifiques, chaque aliment a une flore typique en micro-organismes. Dans les denrées peu hydratées comme les céréales ou les grains de café, les croissances bactériennes sont toujours très lentes et ce sont les moisissures qui deviennent les acteurs principaux (Cahagnier *et al.*, 1998). La présence de moisissures sur les aliments ne signifie pas nécessairement la présence de mycotoxines. Les facteurs qui affectent la formation des mycotoxines incluent le taux d'humidité, la température, le temps de stockage, la qualité et la composition chimique du substrat, la présence d'oxygène et de dioxyde de carbone, la composition du substrat, la prédominance d'espèces toxigènes, la dispersion des spores, les interactions microbiennes et

la présence d'insectes. La présence d'autres micro-organismes, de bactéries ou autres champignons modifient la croissance des champignons producteurs de mycotoxines. Ceci est en fait dû à une modification du pH qui, par exemple, lorsqu'il baisse peut inhiber la croissance de certains *Aspergilli* (Pfohl-Leszkowicz, 1999 ; Pitt *et al.*, 1997). Sur un substrat donné, les facteurs physiques et chimiques principaux sont (1) l'état de l'eau du substrat, (2) la température, (3) la composition gazeuse.

Dans le but de définir des conditions applicables dans la région centrale du Vietnam, nous focaliserons notre attention sur l'état de l'eau dans le substrat.

Etat de l'eau dans les substances biologiques

(Cahagnier *et al.*, 1998 ; Adams *et al.*, 2002)

a. Teneur en eau

La teneur en eau (communément « humidité ») de la substrat rend compte de l'hydratation d'un produit. Elle s'exprime en gramme d'eau rapportée à 100 g de substance humide. Toutefois, le concept de teneur en eau n'est pas aussi simple qu'il n'y paraît au premier abord : en effet, il faut préciser l'eau qui doit être prise en compte, et définir le zéro de l'échelle des teneurs en eau. Ceci est évidemment essentiel pour la conception des méthodes absolues de dosage.

On admet généralement que l'on doit mesurer quantitativement :

1. d'une part, l'eau liquide existant sous forme de solution (dans les vacuoles cellulaires par exemple), d'inclusion, d'imbibition (cette forme est rare dans les produits dont la teneur en eau est inférieure à 30-35% de substances humides) ;
2. d'autre part, l'eau adsorbée.

Une définition théorique de la teneur en eau a été donnée par Stitt (1958) : « Quantité d'eau présente dans le produit, constituée des molécules dans lesquelles le noyau d'oxygène et les deux noyaux d'hydrogène ont, dans des limites définies, les mêmes distances intermoléculaires que dans l'eau liquide ».

Ce qui revient à dire que l'eau dosable est celle ayant conservée son identité moléculaire. Cette définition étant expérimentalement inapplicable, nous adopterons la traduction pratique qu'en a donné Guibot (1949, 1964) : « Quantité d'eau perdue par la substance lorsqu'on l'amène en équilibre vrai avec une pression de vapeur d'eau nulle, dans des conditions telles que des réactions perturbatrices éventuelles soient évitées ».

La teneur en eau, grandeur caractéristique de la quantité d'eau contenue par une substance, est insuffisante pour rendre compte des propriétés fonctionnelles de l'eau, en particulier de sa « disponibilité » biochimique et de son rôle dans les mécanismes d'altération. En effet, même si d'une manière générale une augmentation de l'humidité entraîne une accélération des réactions d'altération, le critère « teneur en eau » ne permet aucune généralisation d'un produit à un autre.

b. Activité de l'eau

Le concept thermodynamique d'activité de l'eau a été introduit il y a déjà assez longtemps (1936) par Lewis qui semble avoir été le premier à parler d' « Activity of water », d'où l'abréviation maintenant universellement utilisée d' a_w . L'activité de l'eau est un paramètre thermodynamique qui se définit par rapport au « potentiel chimique » de l'eau :

$$\mu_{(PT)} - \mu'_{(PT)} = RT \log(a_w)$$

où μ est le potentiel chimique de l'eau dans le produit, μ' celui de l'eau pure à la même température T (°K) et à la même pression P , et R est la constante de gaz parfaits.

c. Corrélation entre a_w , teneur en eau et humidité relative : la courbe isotherme de sorption- désorption

Lorsqu'un produit est placé dans une atmosphère gazeuse contenant de la vapeur d'eau, des échanges se produisent entre les deux phases en présence :

- transferts de chaleur, qui tendent à équilibrer les températures entre les deux phases.
- transferts de masse (molécules d'eau) qui tendent à équilibrer les pressions de vapeur d'eau entre les deux phases.

Lorsque l'équilibre thermodynamique est atteint, les températures et les pressions sont égales dans les deux phases, les molécules d'eau étant quantitativement distribuées entre :

- d'une part, les phase solides, où l'on peut définir les teneurs en eau et les activités de l'eau, et
- d'autre part, la phase vapeur où l'on peut mesurer la pression partielle de vapeur d'eau (p), ou encore l'humidité relative (HR) qui est le rapport de la pression p à la pression saturante p' de l'eau pure à la même température (T) :

$$HR = (p/p')_T \times 100$$

Dans les conditions d'équilibre, et en admettant que l'eau est un gaz parfait, on montre qu' a_w peut être numériquement identifiée au rapport de pression partielles de vapeur d'eau

$$a_w = p/p' = HR \% / 100$$

C'est grâce à cette équivalence que l'on peut mesurer l' a_w en mesurant l'HR de l'air en équilibre avec le produit (pour insister sur la notion d'équilibre, on parle parfois d'HRE- Humidité Relative d'Equilibre) ; autrement, et sauf cas très particulier, l' a_w est inaccessible directement à la mesure.

A température constante, il existe donc pour un produit pur en équilibre thermodynamique avec l'atmosphère, une relation univoque entre la teneur en eau du produit d'une part, et l' a_w de ce produit ou l'HR de l'atmosphère d'autre part. Dans toutes les discussions sur l'état de l'eau et son rôle en technologie, on admet généralement :

- qu'il y a équilibre thermodynamique entre les phases, et par conséquent, que l'équivalence ci-dessus est vraie ;

- que l'on peut, dès lors, utiliser indifféremment l'un ou l'autre terme ; toutefois, il est fondamental de comprendre que l'équivalence n'est vraie que s'il y a un équilibre thermodynamique entre le produit et l'atmosphère ; s'il n'y a pas d'équilibre (produit en cours de séchage par exemple), cette égalité n'a plus aucun sens.

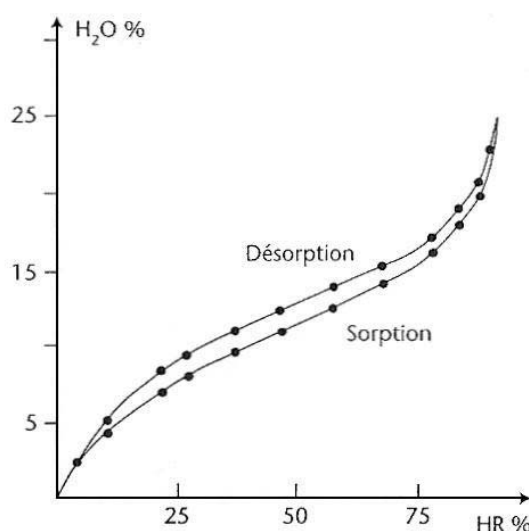


Figure 17 : Courbes isothermes de sorption d'une céréale à 20°C
(Cahagnier, 1998)

d. A_w dans un système en déséquilibre thermodynamique

Il arrive très fréquemment qu'un produit biologique initialement en équilibre thermodynamique subisse des modifications des paramètres de l'équilibre qui créent des gradients à l'intérieur de la substance : gradients de température, de pression de vapeur d'eau, migration d'eau, etc. C'est le cas, par exemple, d'un processus de séchage ou d'un tissu vivant soumis aux phénomènes de régulations physiologiques évoqués dans l'introduction.

Tant qu'un nouvel état d'équilibre n'est pas atteint (ce qui peut-être fort long), la relation $a_w = \text{HR}\% / 100$ n'est plus valable, le concept d' a_w n'a, du reste, plus de sens et la signification de la courbe de sorption devient très difficile à évaluer.

Contrôle de l' a_w dans les milieux de culture

Toute étude des effets de l' a_w sur le comportement fongique nécessite une méthode permettant de maintenir constante l' a_w du milieu de culture. Nous pouvons utiliser quelques méthodes comme suit :

- Ajout d'eau et équilibre du milieu avec des atmosphères HRE connues. La connaissance de l'isotherme de sorption du milieu de croissance permet d'obtenir l' a_w voulue par ajout d'eau. Cette méthode est très employée pour les produits solides ; une homogénéisation du mélange est nécessaire. Au moment de la mise en culture proprement dite, l'échantillon inoculé est maintenu à température constante (la même que celle de l'isotherme de sorption) dans une enceinte non close dont l'HRE de l'atmosphère est régulée à l'aide d'une solution saline saturée (Rockland, 1960 ; Adams *et al.*, 2002). Ces solutions présentent l'avantage de ne pas être affectées par les gains ou pertes en eau au cours de l'équilibre.

- Addition de solutés au milieu. Cette méthode est utilisée principalement pour les milieux liquides. Elle consiste à ajouter des solutés tels que le NaCl, le saccharose ou le glycérol. Notons qu'avec cette méthode, les résultats sont souvent affectés par la nature du soluté. Le glycérol est souvent préféré aux sels ou aux sucres, encore faut-il s'assurer que le champignon ne l'utilise pas comme source de carbone (Cahagnier *et al.*, 1998).

Objectif de ce travail

Au Viet nam, le plant de riz est, en général, cultivé deux fois par an : la première fois, le repiquage les plants de riz se fait en décembre et la récolte en mars ; et la deuxième fois, le repiquage a lieu en mai et la récolte en août. Après la récolte, le riz non-décortiqué (le paddy – Figure 18) est séché au soleil ou dans un sécheur et il est ensuite stocké dans les granges. Après décortiquage, on obtenu le riz décortiqué qui est utilisé à l'exportation ou pour le commerce local. Le riz à l'exportation est bien conservé et sa qualité est souvent contrôlée. Mais la conservation et le contrôle du riz commercialisé localement sont négligées.



Figure 18 : Riz non-décortiqué (gauche) et décortiqué (droite).

Au Vietnam, le riz est vendu au marché sans emballage adéquat (Figure 19), exposé à un environnement chaud et humide. L'humidité et la température élevées sont des facteurs favorisant la croissance des moisissures, productrices de mycotoxines. Ainsi les risques de contamination par les mycotoxines sont bien réels.



Figure 19 : Au Vietnam, le riz vendu au marché sans emballage.

En effet, quelques travaux réalisés préalablement sur la présence des mycotoxines dans le riz au Sud de Vietnam (la Cochinchine) indiquent que la teneur d'AFB1 peut atteindre 27 ng/g de riz (Son, 1998). Une autre étude réalisée au Sud du Vietnam a démontré que la contamination en OTA était importante et pouvait atteindre 26 ng/g de riz (Trung, 2001).

La co-contamination de CIT-OTA, AFB1-OTA et AFB1-OTA-CIT a été observée dans les échantillons d'autres aliments comme le blé (Vrabcheva, 2000) et les céréales du petit déjeuner (Pfohl-Leszkowicz, 2004 ; Molinié, 2005) ou des olives (El Adlouni, 2006 ; Ghitakou *et al.*, 2006).

Donc, nous nous limiterons à ces trois mycotoxines : l'AFB1, la CIT et l'OTA.

L'objectif de cette étude est :

L'identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines (aflatoxine B1, citrinine et ochratoxine A) dans le riz commercialisé dans les provinces (Quang Nam, Quang Ngai, Binh Dinh, Phu Yen, et Nha Trang) de la région centrale du Vietnam ainsi que l'étude des conditions contrôlant la production de ces mycotoxines.

Le mot « riz » utilisé dans la suite du document indique le riz décortiqué.

Partie 2 : Résultats

1. Degré de contamination du riz décortiqué de cinq provinces de la région centrale du Vietnam par l'aflatoxine B1, la citrinine et l'ochratoxine A.
2. Identification de la mycoflore et choix des souches de moisissure produisant des mycotoxines (AFB1, CIT et OTA) dans le riz de cette région.
3. Seuil de l'activité de l'eau minimale pour la formation des mycotoxines sur le riz ; et proposition de conditions de conservation du riz.

1. Etude du degré de contamination par les mycotoxines : aflatoxine B1 (AFB1), citrinine (CIT) et ochratoxine A (OTA) dans le riz de cinq provinces de la région centrale du Vietnam.

La cancérogenèse des mycotoxines de produits alimentaires constitue un des problèmes sérieux de santé. Les cancers provoqués par ces toxines sont restés longtemps inconnus. C'est pourquoi la présence des mycotoxines dans les céréales n'était pas un souci majeur de santé publique. Il a fallu attendre l'année 1960 pour qu'on prenne conscience que ces substances ne sont pas que de simples souillures dans les denrées alimentaires et qu'elles sont hautement toxiques (Blount, 1960 ; Allcroft *et al.*, 1963).

La présence de mycotoxines dans la nourriture animale associée à la découverte de ces mycotoxines et leurs métabolites dans les tissus animaux et l'observation d'effets aigus et chroniques chez les animaux justifient les efforts de recherche consacrés à la mise au point de méthodes performantes d'analyse en vue d'isoler et de doser ces substances en faibles concentrations dans les denrées alimentaires.

1.1. Méthode d'analyse simultanée d'AFB1, CIT et OTA.

1.1.1. Introduction concernant les méthodes de dosage d'AFB1, CIT et OTA.

Les principales étapes de la détermination des mycotoxines sont présentées dans la figure 20. L'obtention d'un échantillonnage représentatif est particulièrement importante pour la détermination des mycotoxines. La distribution des mycotoxines dans les aliments n'est pas homogène. En effet, les moisissures et les mycotoxines sont souvent formées au niveau de poche de condensation. Donc, il est relativement difficile de prélever des échantillons représentatifs d'un lot, et ceci d'autant plus que le lot est grand. Pour l'analyse en HPLC, la quantité d'une prise d'essai varie de 20 à 100g. (Deshpande, 2002, Blanc, 2006)

Toute procédure d'analyse de mycotoxines comporte quatre étapes : préparation de l'échantillon, extraction, purification ou isolation, et dosage. Pour la préparation, l'échantillon est broyé et homogénéisé. Les mycotoxines sont extraites avec des solvants spécifiques. Le solvant le plus utilisé est un mélange d'alcane chloré (par exemple chloroforme) et d'eau. Il peut être remplacé par le système de méthanol- eau ou d'acétonitrile- eau.

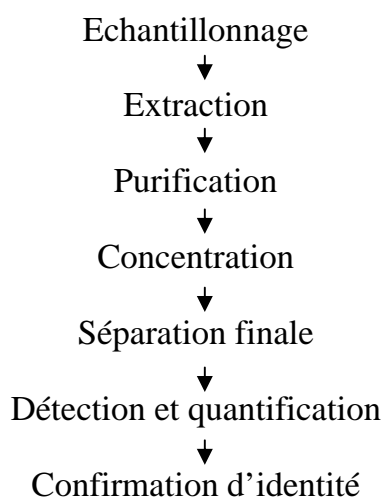


Figure 20 : Etapes de bases de la détermination des mycotoxines.

Le filtrat de l'extrait est purifié soit sur colonne, ou par partition avec des solvants appropriés. L'extrait purifié peut être analysé soit par chromatographie liquide, soit par électrophorèse capillaire ou par une méthode immunochimique. (Stoloff, 1982 ; Trucksess *et al.*, 2001; Dashpande, 2002). Parmi ces méthodes pré-citées, la chromatographie en phase liquide à haute performance est la plus utilisée.

Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

Principe

La Chromatographie Liquide Haute Performance, appelée du nom de son abréviation HPLC, est une technique de séparation universelle, avec pour seule exigence la solubilité de l'échantillon dans la phase liquide mobile. Il s'agit du même principe que la chromatographie classique sur colonne, mais en raison de l'utilisation de la phase solide stationnaire finement divisée dans la colonne, une

haute pression s'exerçant sur la phase mobile est nécessaire pour vaincre la perte de charge assurant ainsi le débit de la phase mobile, donc la réduction du temps d'élution.

La séparation des produits est fondée sur plusieurs phénomènes : partage, adsorption, échange d'ions et exclusion. La méthode HPLC utilisée pour la séparation et la caractérisation des mycotoxines est la chromatographie de partage à polarité de phase inversée. La phase stationnaire utilisée est constituée de groupements C18 greffés sur un support de silice (Rouessac, 1994).

Description du système

La chaîne HPLC est constituée de divers éléments schématisés ci-après sur la figure 21

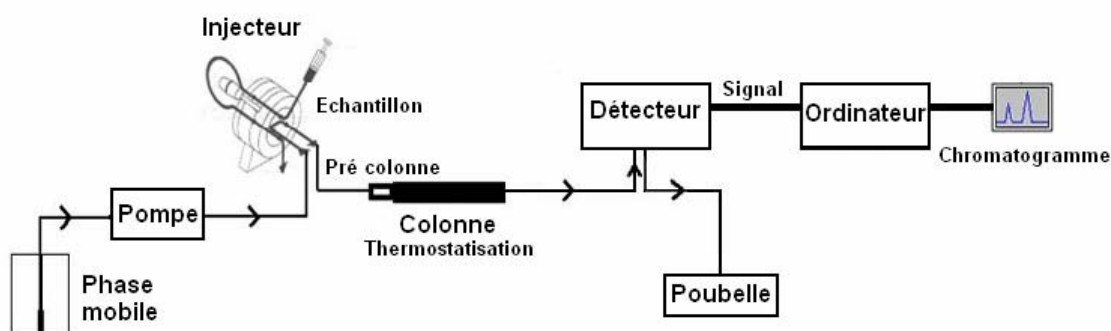


Figure 21 : Schéma d'une chaîne HPLC

La phase mobile alimente le chromatographe en permanence : elle est délivrée par une pompe dont le débit est modulable. Les composés à séparer, dissous préalablement dans un solvant, sont prélevés à l'aide d'une seringue puis injectés au niveau d'un injecteur équipé d'une boucle d'injection. Les molécules sont entraînées par la phase mobile vers la colonne chromatographique contenant la phase stationnaire. L'affinité des composés pour la phase stationnaire déterminera leur temps de rétention. Un détecteur fluorimétrique à la sortie de la colonne suit en permanence le passage des composés séparés. Les signaux enregistrés, lors de passage en fonction du temps, traités par ordinateur, sont donnés sous forme d'un chromatogramme. Une bonne séparation se traduira par

un pic ou signal isolé, fin et symétrique spécifique à chaque composé dont la surface déterminée par un intégrateur, est fonction de sa concentration.

L'enregistrement et le traitement des signaux sont effectués par un logiciel adapté. Pour les mycotoxines, leur concentration est calculée à l'aide d'une courbe étalon préalablement établie avec des solutions de mycotoxines de concentrations connues.

L'AFB1 pure n'est pas stable sous l'UV. C'est pourquoi, au cours d'une analyse chromatographique, il faut utiliser une source d'excitation de fluorescence qui n'émet pas ou faiblement de rayons UV.

La confirmation de la présence d'AFs dans un échantillon par HPLC demande une dérivation des AFB1 et AFG1. Ceci est nécessaire afin d'augmenter leur fluorescence naturelle sous l'UV, et de pouvoir ainsi mieux les détecter. Jusqu'à ce jour, les seules options disponibles pour la dérivation des AFs impliquent l'utilisation :

- d'Acide Trifluoroacétique (TFA),

Pour le TFA, le réactif est ajouté avant la colonne d'HPLC (c'est à dire en pré-colonne) et cette dérivation nécessite une étape d'évaporation. Celle-ci doit être réalisée avec beaucoup de précautions pour éviter la perte des aflatoxines par leur adsorption à la surface du verre du ballon d'évaporation lors de la récupération du résidu. De plus, le TFA est un réactif très corrosif et dangereux à manipuler. Cette réaction de dérivation dure 30 minutes à 50° C.

- de Perbromure Bromure de Pyridinium (PBPB).

La méthode au PBPB, quant à elle, implique l'addition du réactif dilué à l'éluant de la colonne HPLC. Elle se réalise à 20°C dans un capillaire de réaction de 30 cm. Les inconvénients de cette méthode sont la difficulté rencontrée pour dissoudre le PBPB et la stabilité de ce réactif.

- d'Iode (I2).

La méthode de dérivation post colonne à l'iode, la plus répandue, présente également des inconvénients. Elle nécessite l'addition d'iode dans un capillaire de réaction par une seconde pompe, celui-ci devant être maintenu à 70°C grâce à un

bain d'eau ou à une chambre thermostatée. La réaction de dérivation dure 40 secondes à 70°C. Cette méthode requiert donc un équipement supplémentaire et une préparation journalière d'une solution saturée d'iode, due au caractère instable de celle-ci. Il est également nécessaire de nettoyer très souvent l'équipement HPLC afin d'éviter la formation de cristaux d'iode dans les capillaires.

- KOBRA Cell

La « KOBRA Cell » offre une méthode de dérivation alternative qui présente l'avantage d'être très simple à mettre en oeuvre et d'offrir les mêmes performances que la dérivation à l'iode. La KOBRA Cell est une cellule électrochimique qui génère en ligne l'agent de dérivation à partir de bromure de potassium présent dans la phase mobile. La réaction dure 4 secondes à température ambiante et ne nécessite pas de préparation journalière de réactif. Aucun équipement supplémentaire n'est requis et la cellule demande très peu d'entretien. Elle est vendue par R-Biopharm France.

La technique HPLC a été successivement appliquée pour analyser la CIT dans des grains (Lepom, 1986, Zimmerli *et al.*, 1989, Meister, 2004), des cultures fongiques (Frisvad, 1987 et Frisvad *et al.*, 1987), du fromage (Franco *et al.*, 1996 et Vazquez *et al.*, 1996), divers aliments (Schneweis *et al.*, 2001), du riz (Xu *et al.*, 2003, Meister, 2004) et des fluides biologiques (Phillips *et al.*, 1980, Orti *et al.*, 1986). Les méthodes utilisées diffèrent significativement entre elles par la nature de la phase stationnaire à phase normale (phase stationnaire polaire, phase mobile peu ou non polaire) ou à phase inverse (phase stationnaire non polaire, phase mobile polaire) caractérisée par des temps d'élution plus faibles. La plupart des chromatographies sont en phase inverse (*reverse phase*) fondée sur une phase mobile polaire acide à base d'acide ortho phosphorique avec détection de la fluorescence (Lepom, 1986, Orti *et al.*, 1986, Scudamore et Hetmanski, 1992 et Scudamore *et al.*, 1997), ou UV (Phillips *et al.*, 1980)

La fluorescence de la CIT provoquée par excitation à la longueur d'onde adéquate (331nm) permet une détection de l'ordre du ng/g. La détection par

fluorescence de la CIT est 100 fois plus sensible que la détection par UV (Vail *et al.*, 1990).

Les séparations sélectives sont obtenues par utilisation de systèmes d'éluants ternaires ou quaternaires. Le temps de rétention de la CIT dépend du pourcentage d'eau de l'éluant. Par contre, la composition et le taux des solvants déterminent l'ordre d'élution et la résolution des mycotoxines (CIT et OTA) avec d'autres produits (Reinhard & Bernhard, 1999).

La co-extraction ainsi que la purification des mycotoxines CIT et OTA ont été effectuées sur le blé et l'orge (Lepom, 1986) et également pour des céréales du « petit-déjeuner » (une matrice complexe) (Molinié *et al.*, 2005, Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2004).

L'idéal est de pouvoir détecter plusieurs mycotoxines simultanément dans un aliment. Ainsi l'utilisation de colonnes d'immunoaffinité pour la purification de plusieurs mycotoxines présente peu d'intérêt. Dans le riz, il a été démontré par d'autres auteurs la présence d'AFB1 (Son *et al.*, 1998 ; Park *et al.*, 2004), de CIT (Shu *et al.*, 2002) et d'OTA (Trung *et al.*, 2001 ; Park *et al.*, 2005) ; Dans quelques aliments, il y avait la co-présence de CIT et d'OTA (Lepom, 1986 ; Vazquez *et al.*, 1996 ; Molinié *et al.*, 2005, El Adlouni *et al.*, 2006).

La mise au point de méthodes permettant de détecter et quantifier simultanément ces différentes mycotoxines est primordiale.

1.1.2. Matériels et méthodes

a. Produits chimiques

Le chlorure de potassium, l'acide phosphorique, l'acide chlorhydrique sont de qualité « pour analyse ». Les solvants : méthanol, acétonitrile, propanol-2, *n*-hexane, chloroforme sont de qualité pure pour HPLC. L'ensemble des solutions est préparé avec de l'eau miliQ, ultra-purifiée et déminéralisée. Des toxines standard sont de Sigma Chemicals.

b. Préparation des solutions standard

Les solutions standard de mycotoxines : AFB1, CIT et OTA, sont préparées par dissolution d'un milligramme de chaque mycotoxine (AFB1, CIT ou OTA) qui est pesé sur la balance de précision, dans un millilitre de méthanol. La concentration de la solution standard de l'AFB1 est déterminée par mesure de l'absorbance en UV à 360 nm, le coefficient d'absorption molaire ϵ de 21800 mol⁻¹ cm⁻¹ (IARC, 1982), celle de la CIT à 321 nm, ϵ de 5490 mol⁻¹ cm⁻¹ (Molinié *et al.*, 2004) et celle de l'OTA à 333 nm, ϵ de 5440 mol⁻¹ cm⁻¹ (IARC, 1993).

Une gamme de concentrations de solution standard de 3,125 à 100 ng de chaque mycotoxine par mL de méthanol est préparée ce qui correspond à des teneurs dans le riz de 0,078 à 2,5 ng/g de riz. Ces solutions sont utilisées pour étalonner les réponses du détecteur de HPLC.

c. Confirmation de la présence de l'OTA

La confirmation de la présence de l'OTA dans certains échantillons de riz est réalisée par l'hydrolyse de l'OTA en OT α (OTA ayant perdu la phénylalanine) détectée facilement lors de la séparation par HPLC selon la technique suivante. Un volume connu de l'extrait purifié d'échantillon est évaporé à sec. Le résidu est dissous dans 975 μ l d'une solution de tampon pH 7,5 (0,04 M Tris-HCl, 1 M NaCl). Puis, 25 μ l de la carboxypeptidase (100 U/ml H₂O) sont ajoutés et le mélange est incubé à la température ambiante jusqu'au lendemain. La disparition du pic spécifique de l'OTA simultanément à l'apparition spécifique du pic d'OT α .

d. Confirmation de la présence de l'AFB1 et de l'AFB2

L'AFB1 et l'AFB2 sont confirmée par sa transformation dans la Kobra cell®, placée en post-colonne, en son dérivé 9,10-dibromé, qui est détecté par spectrofluorimétrie.

1.1.3. Procédure d'analyse simultanée d'AFB1, CIT et OTA.

a. Extraction des toxines de riz

Vingt grammes de riz finement broyés sont extraits avec 100 mL du mélange acétonitrile –chlorure de potassium 4% (9 :1). Ce mélange ajusté à pH 1,5 avec l'acide chlorhydrique, est agité sur un agitateur orbital pendant 20 minutes. Le broyat est filtré sous vide sur un filtre de papier Whatman No. 4.

b. Purification

Le filtrat est dégraissé grâce à l'hexane. 100 mL d'hexane sont ajoutés au filtrat et le mélange est agité pendant 10 minutes. La phase supérieure (hexane) est éliminée. Cette opération est répétée une seconde fois en ajoutant 50 mL de hexane. La phase inférieure (aqueuse) est récupérée. Les toxines sont extraites par 50 mL de chloroforme. Après une agitation, la phase inférieure (chloroforme) est récupérée. La phase aqueuse est re-extraite deux fois par du chloroforme (2 x 25 mL). Les phases chloroformiques sont groupées. Le chloroforme est éliminé à 40°C sous vide dans un évaporateur rotatif. Deux mL de méthanol sont ajoutés au résidu et la solution est soniquée puis filtrée sur un papier filtre. Finalement, le filtrat est séché sous l'atmosphère d'azote. Le résidu est dissous dans 500 µl de méthanol. Cette solution servira au dosage par HPLC.

c. Conditions de HPLC

Un chromatographe Shimadzu (Kyoto, Japon) LC-10 équipé d'un boucle d'injecteur de 20 µl, d'une colonne (3µm C18, 0.46 x 25 cm) et d'un détecteur fluorimétrique (Spectra physic 2000), est utilisé. Les conditions optimales de détection pour chaque toxine sont obtenues en appliquant les paramètres d'excitation et d'émission de fluorescence suivant : 365 et 440 nm pour AFB1; 335 et 465 nm pour OTA; 331 et 500 nm pour CIT). La phase mobile H₃PO₄ (0,33 M)/ acétonitrile/ propanol-2 (650/400/50) est utilisée en mode isocratique avec un débit d'écoulement de 0,5 mL/min ; les temps d'élution sont 14 min (AFB1), 28 min (CIT) et 56 min (OTA) (Figure 22)

Les chromatogrammes sont traités par Class-LC software 1.6 Shimadzu.

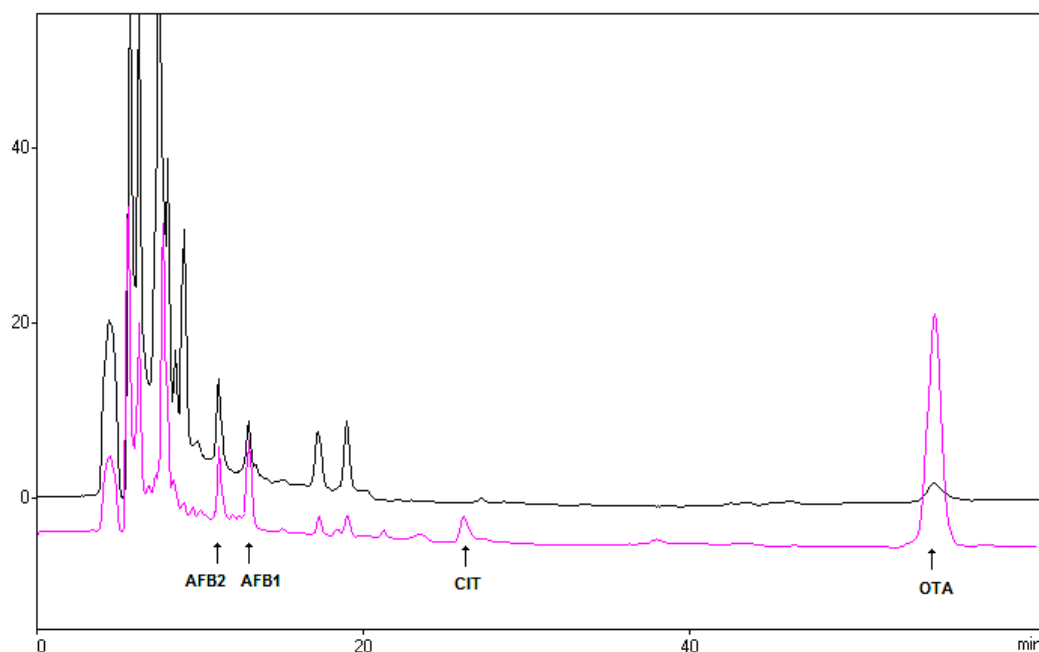


Figure 22 : Comparaison des chromatogrammes de séparation des mycotoxines isolées d'un riz contaminé (noir) et d'un riz non-contaminé enrichi en mycotoxines standard (rose).

1.1.4. Résultats et discussion

- Contamination provoquée et taux de récupération

Cinq échantillons de 20 g de riz exempts de toxines ont été sur-contaminés par addition de mycotoxines standard (AFB1, CIT, et OTA) pour obtenir des mélanges ayant 5ng de mycotoxine/ g de riz. Puis on procède à l'extraction et au dosage dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

Tableau 5 : Moyenne de récupération et déviation standard relative de chaque mycotoxine

Mycotoxine	Moyenne de recouvrements (%)	Écart-type relatif (%)
AFB1	90,05	6
CIT	84,08	6,7
OTA	102,7	5,4

Les résultats obtenus (tableau 5) démontrent une bonne récupération des toxines par cette méthode. Ils répondent aux exigences de la législation d'Union Européenne (Nos. 472/2002 et 26/2002) qui stipule que pour des solutions de teneurs de toxines entre 1 et 10 ng/g, les récupérations de 70-110% sont acceptables. L'écart-type relatif doit être inférieur à 20%.

- Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)

LOD et LOQ sont déterminés en utilisant 3,3 et 10 fois la déviation standard divisée par la pente de la courbe d'étalonnage de chaque toxine. Les résultats sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : LOD et LOQ de AFB1, CIT et OTA extrait du riz

	AFB1	CIT	OTA
LOD (ng/g riz)	0,07	0,11	0,08
LOQ (ng/g)	0,22	0,35	0,25

Toutes les valeurs de LOD et LOQ et de l'AFB1, la CIT et l'OTA sont inférieures à 0,4 ng/g. Elles sont semblables à celles obtenus par d'autres auteurs : LOD et LOQ de l'OTA sont 0,05 et 0,2 ng/g (Molinié *et al.*, 2005); LOD de la CIT est 0,1 ng/g (Zimmerli *et al.*, 1989 ; Vail *et al.*, 1990) ; LOD de l'AFB1 est 0,15 ng/g (Ghitakou *et al.*, 2006).

- Effets de la lumière et de la température sur les pics d'AFB1

Il faut protéger l'extrait de la lumière et de la température élevée, car l'AFB1 peut se transformer en d'autres composés. Ainsi on peut voir sur les chromatographies trois pics différents représentant vraisemblablement trois produits issus de l'AFB1. Le pic d'AFB2 reste inchangé, on pourra donc utiliser l'AFB2 comme repère pour observer le changement du pic d'AFB1 (Figure 23).

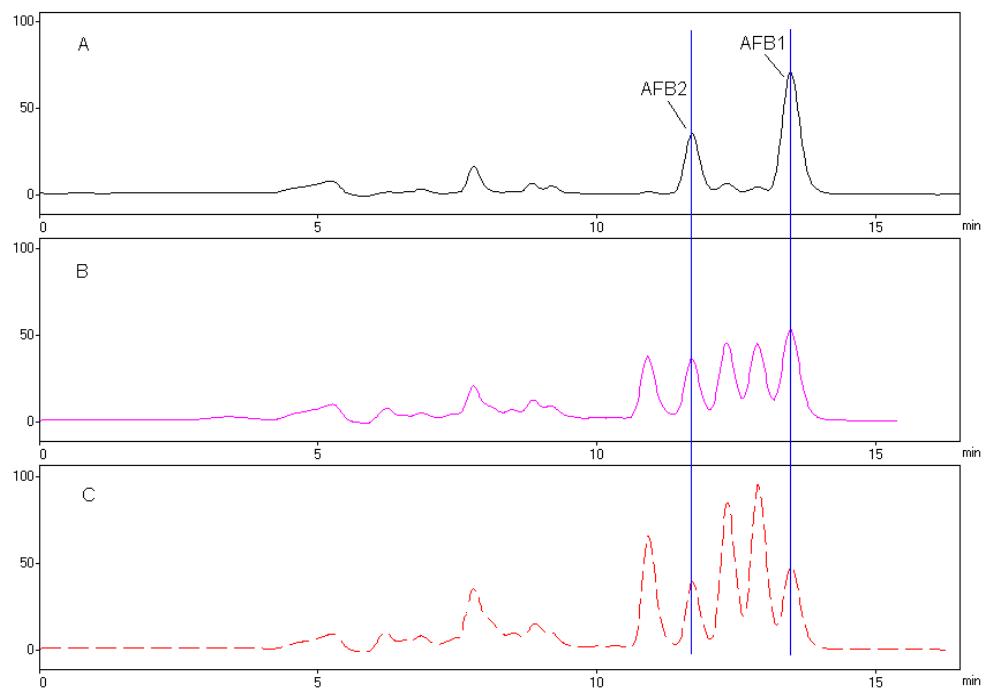


Figure 23 : Evolution des chromatogrammes d'aflatoxines
 (A) protégé de la lumière ; (B) lumière / 4h (C) lumière / 24h

1.2. Occurrence d'aflatoxin B1, citrinine et ochratoxine A dans le riz de cinq provinces de la région centrale du Vietnam.

1.2.1. Echantillonnage

Cinquant échantillons du riz de 500 g ont été récoltés pendant le mois de novembre 2004 (saison des pluies), et cinquante échantillons pendant le mois d'avril 2005 (saison sèche) sur les grands marchés des cinq provinces citées. Ils ont été conservés à -20°C dans des sacs en plastique jusqu'à l'analyse.

1.2.2. Résultats et discussion

Les résultats analytiques des 100 échantillons de 5 provinces de la région centrale du Vietnam sont présentés dans les tableaux 7 et 8.

Comme on peut voir dans les tableaux 7 et 8, l'AFB1 est trouvé dans la moitié des échantillons (51%). L'AFB1 est présente dans les cinq provinces de la région centrale de Vietnam. La CIT n'est détectée que dans 14 échantillons. On remarque qu'un tiers (32%) des échantillons a été contaminé par l'OTA Qui n'est pas quantifiable dans le riz dans la province de Quang Nam. La contamination en AFB1 est la plus importante.

Tableau 7 : Résultat des contaminations en mycotoxines de l'ensemble des 100 échantillons de riz collectés dans les 5 provinces de la région centrale du Vietnam.

Mycotoxine	Échantillons contenant mycotoxines détectables	Échantillons dont la teneur en mycotoxines est quantifiable ($>\text{LOQ}$)		
	Nombre/ 100 échantillons	Nombre/100 échantillons	Moyenne (ng/g)	Maximum (ng/g)
AFB1	51	38	3,31	29,82
CIT	14	7	0,38	0,42
OTA	32	20	0,75	2,78

Tableau 8 : Répartition des contaminations en fonction de la région de provenance du riz.

Province	Climat	Nombre d'échantillons	Mycotoxines	Échantillons - mycotoxines détectables	Échantillons - mycotoxines quantifiables (>LOQ)		
				Nombre	Nombre	Teneur moyenne (ng/g)	Teneur maximale (ng/g)
Quang Nam	Saison des pluies	10	AFB1	7	7	10,08	29,82
			CIT	1	0	-	-
			OTA	0	0	-	-
	Saison sèche	10	AFB1	5	5	1,77	4,44
			CIT	0	0	-	-
			OTA	4	0	-	-
Quang Ngai	Saison des pluies	10	AFB1	8	5	4,5	12,43
			CIT	0	0	-	-
			OTA	0	0	-	-
	Saison sèche	10	AFB1	4	2	0,55	0,65
			CIT	1	0	-	-
			OTA	8	7	0,58	0,87
Binh Dinh	Saison des pluies	10	AFB1	7	5	0,58	0,75
			CIT	4	4	0,42	0,42
			OTA	2	1	0,35	0,35
	Saison sèche	10	AFB1	1	1	1,34	1,34
			CIT	0	0	-	-
			OTA	4	2	1,03	1,63
Phu Yen	Saison des pluies	10	AFB1	7	5	0,95	2,33
			CIT	5	3	0,34	0,38
			OTA	2	1	0,29	0,29
	Saison sèche	10	AFB1	2	1	0,89	0,89
			CIT	0	0	-	-
			OTA	7	5	0,85	1,87
Nha Trang	Saison des pluies	10	AFB1	8	5	2,21	7,2
			CIT	3	0	-	-
			OTA	0	0	-	-
	Saison sèche	10	AFB1	2	2	0,96	1,41
			CIT	0	0	-	-
			OTA	5	4	0,99	2,78

Nous classons les données en fonction de la mycotoxine, de la région de provenance du riz et de la saison (tableau 8). Les résultats du tableau 8 et des figures 24 et 25 suggèrent que le climat pourrait influencer la contamination du riz par ces mycotoxines. A la saison des pluies, le taux d'échantillons contaminés et la moyenne d'échantillons quantifiables de AFB1 dans le riz sont significativement plus élevés qu'en saison sèche ($p < 0.05$), excepté pour la province de Binh Dinh (figure 25). Par exemple, la teneur d'AFB1 trouvée dans le riz de la province de Quang Nam est sept fois plus élevée en saison de pluie qu'en saison sèche.

D'une manière générale, la teneur en AFB1 est inférieure à la limite fixée par l'OMS : la teneur en AFB1 autorisée doit être inférieure à 30 ng/g. La Communauté d'Européenne a fixé, par l'arrêté du 16 Juillet 1998, une teneur maximale de 2 ng/g d'AFB1 dans les aliments destinés à la consommation humaine et de 4 ng/g pour l'ensemble des 4 AF (Adams, 2002). Dix échantillons dépassent cette limite. Très récemment cette valeur limite vient d'être portée à 8ng/g (Règlement (CE) N° 1881/2006). Seul un échantillon dépasse cette nouvelle législation.

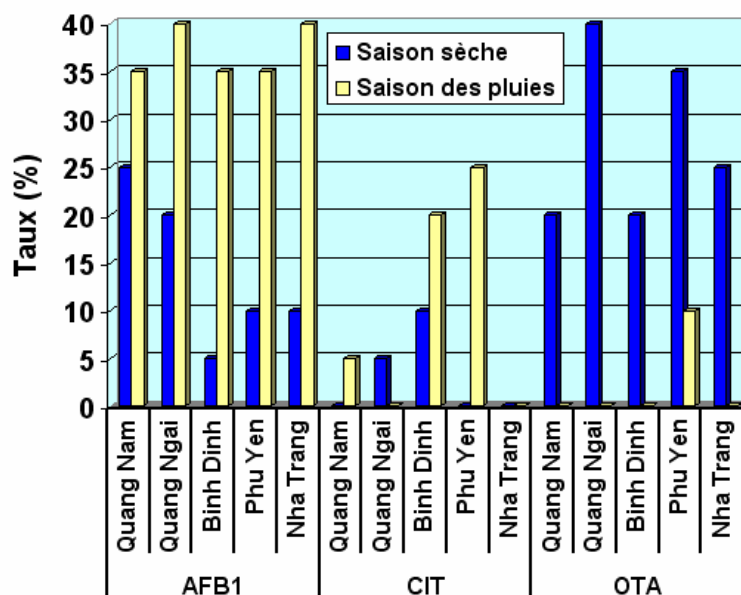


Figure 24 : Taux d'échantillons contaminés AFB1, CIT et OTA dans le riz des cinq provinces.

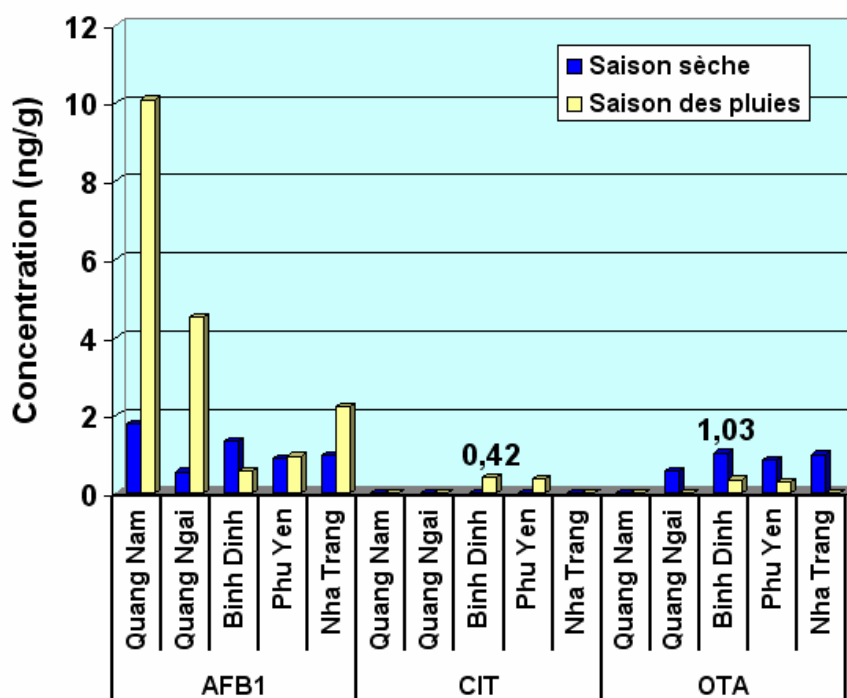


Figure 25 : Moyenne de contamination en AFB1, CIT et OTA (ng/g) dans le riz des cinq provinces.

L'aliment de base pour beaucoup de pays en Asie est le riz. La consommation moyenne de riz par un Vietnamien adulte est estimée à 500 g/jour. Pour l'échantillon le plus contaminé en AFB1 (29,82 ng/g), la quantité d'AFB1 ingéré par un homme de 60 kg a été de 248,5 ng/kg p.c./jour (15 µg / jour)

Comme cela a été signalé à la page 28, la combinaison entre l'AFB1 et l'hépatite de virus B peut conduire à un cancer du foie. Au Vietnam, l'occurrence d'hépatite de virus B est de l'ordre de 12%-20% (Hipgrave *et al.*, 2003). Donc, le risque de cancer pour la population vietnamienne de la région du centre est loin d'être négligeable.

Les teneurs maximales en CIT détectées dans le riz dans les provinces de Binh Dinh et Phu Yen lors de la saison des pluies ont été respectivement de 0,42 ng/g et de 0,38 ng/g. La CIT n'a jamais été détectée en saison sèche.

A l'inverse des autres mycotoxines l'OTA est présente en plus grande quantité lors de la saison sèche comparé à la saison humide. Ainsi dans les provinces de Binh Dinh et Phu Yen des taux allant jusqu'à 1,63 ng/g et 1,87 ng/g

ont été mesurés en saison sèche et sont de 0,35 et 0,29 ng/g en saison humide. Il en est de même pour le riz commercialisé dans les provinces Quang Ngai et Nha Trang dont les quantités sont respectivement de 0,87 ng/g et 2,78 ng/g en saison sèche alors que la contamination en OTA est nulle en saison des pluies. Ce résultats est inverse de ce qui a été observé sur les blés en France (Molinié, 2004). Ceci s'explique sans doute par le fait que les agents responsables de la formation d'OTA sont différents. Dans les régions chaudes les producteurs d'OTA appartiennent au genre *Aspergillus* alors que dans le Nord de l'Europe il s'agit plutôt du genre *Penicillium*.

La Communauté Européenne a fixé une limite de 5 ng/g d'OTA dans les céréales brutes et 3 ng/g dans les aliments transformés ou destinés à la consommation directe humaine. D'après le JECFA (Joint expert committee on food and additives), la consommation tolérable provisoire d'OTA (basée sur la néphropathie chez le porc) est de 100 ng/ kg/ semaine équivalent à 6µg/ semaine pour une personne de 60 kg. Si on tient compte de la législation européenne fondée sur la teneur en OTA, la quantité d'OTA ingérée quotidiennement doit être inférieure à 5 ng/ kg p.c./ jour. C'est-à-dire que l'absorption maximale pour une personne de 60 kg est de 300 ng/ jour. La consommation du riz le plus contaminé correspond à 1390 ng/ jour, soit 4,6 fois plus que la quantité d'OTA tolérée par la CE. Ces résultats laissent prévoir un danger certain pour les consommateurs de riz contaminé en OTA.

Tableau 9 : Pourcentage d'échantillons contaminés simultanément par deux mycotoxines : mycotoxine (A) rapporté au nombre total d'une autre mycotoxine (B).

B \ A	A		
	AFB1	CIT	OTA
AFB1	-	17,65%	21,57%
CIT	64,29%	-	57,14%
OTA	34,38%	25%	-

La co-contamination de mycotoxines présente encore plus de danger en raison de la synergie éventuelle et de leurs effets additifs. Suivant les résultats du tableau 6, on constate que parmi les échantillons contaminés par la CIT, deux tiers sont aussi contaminés par l'AFB1 ou l'OTA (64,29% et 57,14% de ces échantillons) (Tableau 9, Figure 26)

Des co-contaminations ont été observées dans les échantillons d'autres aliments comme le blé (Vrabcheva, 2000) et les céréales du « petit-déjeuner » (Pfohl-Leszkowicz, 2004 ; Molinié, 2005) ou des olives (El Adlouni, 2006 ; Ghitakou *et al.*, 2006).

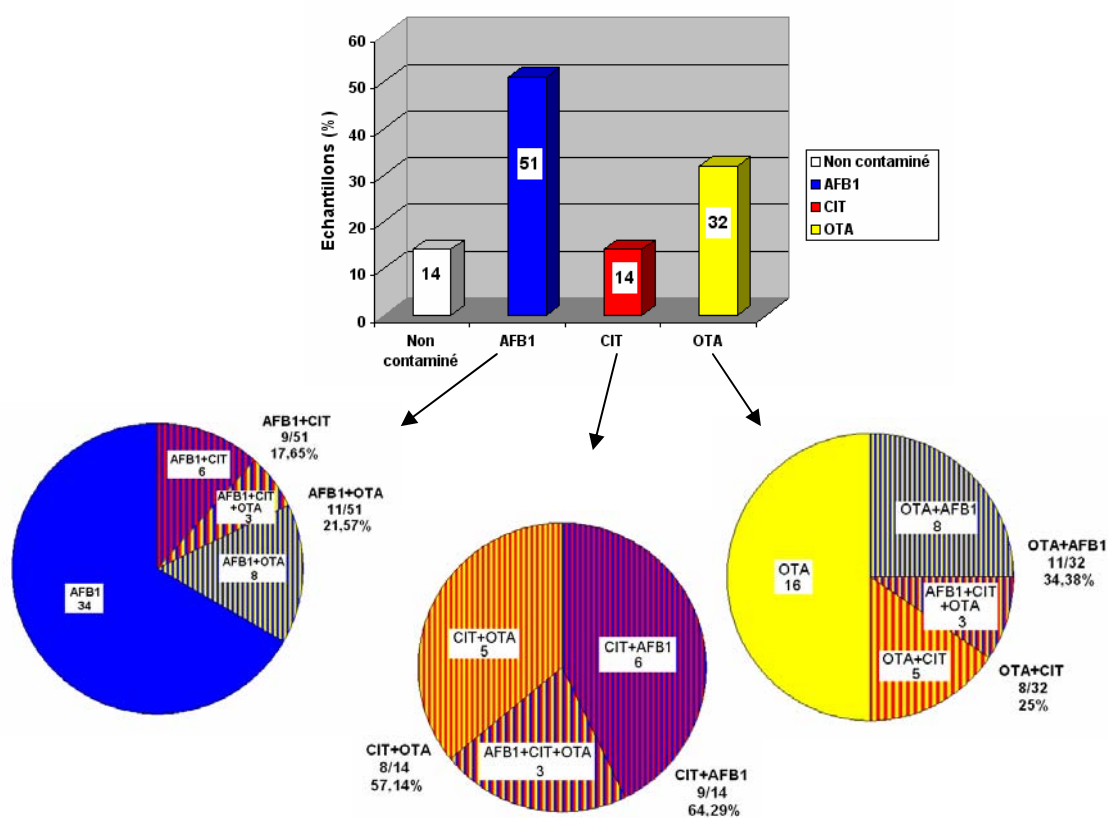


Figure 26 : La co-contamination de mycotoxines.

1.2.3. Conclusion

L'ensemble de ces résultats indique que la contamination du riz par ces mycotoxines dans les cinq provinces de la région centrale du Vietnam est préoccupante. D'une manière systématique, le riz est fortement contaminé en AFB1, ainsi qu'en OTA.

Le niveau de contamination du riz par ces mycotoxines est fortement influencé par les saisons au cours de l'année. La saison des pluies constitue un facteur de risque favorisant le développement de l'AFB1 et de la CIT. Il est donc nécessaire d'avoir une méthode appropriée pour conserver le riz et de proposer un emballage adéquat pour la vente du riz dans les régions citées. De plus, la cocontamination de la CIT avec l'AFB1/OTA dans le riz à taux élevé doit être prise en considération comme le suggère la Commission européenne car on ne connaît que très peu les conséquences sur la santé. Les données existantes indiquent dans la majorité des cas un effet additif voire synergique. (Scientific committee on Food opinion on Ochratoxin A. CS/CNTM/MTC/14 Final annex II to document XXI/2210/98, Brussels : CEC, 1998).

2. Identification de la mycoflore et choix des souches de moisissure produisant AB1, CIT, et OTA dans le riz des cinq provinces de la région centrale du Vietnam.

En sachant que les mycotoxines sont élaborées par des moisissures. Il serait intéressant d'étudier les moisissures productrices des mycotoxines.

2.1. Identification de la mycoflore

Les études menées sur la contamination des moisissures dans le riz non décortiqué et le riz décortiqué montrent que la contamination se produit aussi bien avant que pendant la récolte et/ou au cours du stockage. Chaque période a son mycoflore et le riz décortiqué a également une mycoflore qui lui est propre (cf. pages17-19).

Et dans le cadre de ce travail, nous réalisons l'identification de la mycoflore dans le riz décortiqué et des souches produisant les mycotoxines (AFB1, CIT, OTA). Ce s'avère nécessaire en vue de trouver les conditions optimales de conservation du riz.

Pour atteindre notre objectif, nous avons utilisé la méthode proposée par Pitt *et al.* (1997).

2.1.1. Méthodes pour l'isolement, l'énumération et l'identification des champignons

Cette partie décrit les techniques et les milieux appropriés pour l'isolement et l'identification des mycètes.

a. Techniques d'énumération

La quantification de la croissance des mycètes filamenteux est plus difficile que celle des bactéries ou des levures. L'évaluation de la croissance ou de la biomasse fongique n'est pas facile, parce qu'aucune norme n'existe, contrairement aux levures et bactéries. La croissance végétative se compose des hyphes, qui ne sont pas aisément détachés du substrat. Quand la sporulation se produit, de nombreuses spores peuvent être produites, provoquant des élévations

appréciables de cellules viables, sans augmentation de biomasse.

Bien que les techniques pour mesurer la biomasse aient été améliorées ces dernières années, la plupart des laboratoires d'analyse de produits alimentaires continuent à utiliser le comptage de cellules viables (la méthode de dilution) pour détecter et mesurer la croissance fongique dans la nourriture. La méthode de dilution est utilisée pour l'analyse mycologique des nourritures liquides ou en poudre. Elle est également appropriée aux grains destinés à la fabrication de farine, et à d'autres situations où la contamination fongique totale est recherchée. Il existe également une autre méthode appelée la méthode directe, plus performante pour l'analyse fongique en nourritures.

Méthode directe

La méthode directe est la méthode préférée pour détecter, évaluer et isoler des mycètes des nourritures particulières telles que des grains et des noix. Dans cette méthode, des particules de nourriture sont placées directement sur des milieux d'agar (Figure 27). Dans la plupart des cas, la surface des particules de nourriture doit être préalablement désinfectée avant l'ensemencement, afin d'éviter la contamination éventuelle par le milieu extérieur (poussières d'autres sources). Ceci permet l'identification des mycètes propre de ces particules. Ce processus est plus efficace pour étudier la qualité mycologique inhérente, et permet également une bonne évaluation de la présence potentielle des mycotoxines.



Figure 27 : Colonies de moisissures sur DG18 ensemencé de grains de riz.

La désinfection en surface peut être omise quand les contaminants extérieurs sont de la mycoflore descendant d'un produit alimentaire, par exemple

dans le grain de riz destiné à la fabrication de farine de riz.

Les résultats des analyses par ensemencement direct sont exprimés en taux de particules contaminés. La technique ne fournit aucune indication directe de l'étendue de l'invasion fongique dans les différentes parties. Cependant, il est raisonnable de supposer qu'un taux de contamination élevé est corrélé à l'étendue de l'invasion dans les particules, et constitue un risque de présence de mycotoxine.

b. Milieux d'énumération

Un milieu fongique d'énumération doit contenir des inhibiteurs efficaces. Les milieux fongiques modernes contiennent des antibiotiques à pH neutre pour inhiber les bactéries. De tels milieux permettent une meilleure revivification des mycètes endommagés ou des mycètes sensibles aux milieux acidifiés utilisés généralement dans le passé. Pendant longtemps le Bengale rose a été introduit aux milieux pour limiter la taille des colonies. Plus récemment le 2,6- dichloro-4-nitroaniline (dichloran) a été ajouté pour empêcher la propagation trop rapide des mycètes. Beaucoup de mycètes de détérioration dont des espèces communes sont *Aspergillus* et *Penicillium* en particulier, se développent mieux sur des milieux équilibrés en nutriments. Les milieux décrits ci-dessous sont considérés comme les milieux de numération les plus satisfaisants : DRBC (Dichloran rose bengal chloramphenicol agar) et DG18 (Dichloran 18% glycerol agar).

Dichloran 18% glycerol agar (DG18)

Le DG18 est sélectif pour les mycètes xérophiles issus de nourritures à faible humidité telles que les grains, les noix, la farine et les épices stockés. Le DG18 est approprié pour l'énumération des mycètes et des levures xérophiles non exigeantes. Il permet également la croissance des mycètes communs tels que *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* se développant dans les nourritures. Le DG18 est le milieu de choix pour l'énumération des mycètes poussant sur des nourritures sèches. Il a une activité inhibitrice efficace sur les mycètes de *Mucorale* et les bactéries. Cependant, la croissance des espèces d'*Eurotium* (précédemment connues sous le nom de « groupe d'*Aspergillus glaucus*») est relativement rapide, et des colonies peuvent avoir les bordures diffuses.

L'addition d'un détergent au DG 18 peut apporter une solution à ce problème. Le DG18 est également un milieu satisfaisant d'isolement pour les espèces d'*Eurotium*.

c. Milieux et méthodes d'identification

La technique de Pitt est choisie (Pitt *et al.*, 1997)

- Milieux d'inoculation et régime d'ensemencement

Les trois milieux utilisés sont CYA (Czapek Yeast Extract Agar), MEA (Malt Extract Agar) et G25N (25% Glycerol Nitrate Agar). Leurs compositions sont données dans l'annexe.

Les cultures pour l'identification ont été réalisées sur trois milieux (CYA, MEA et G25N) à 25°C et CYA à 5 et 37°C.

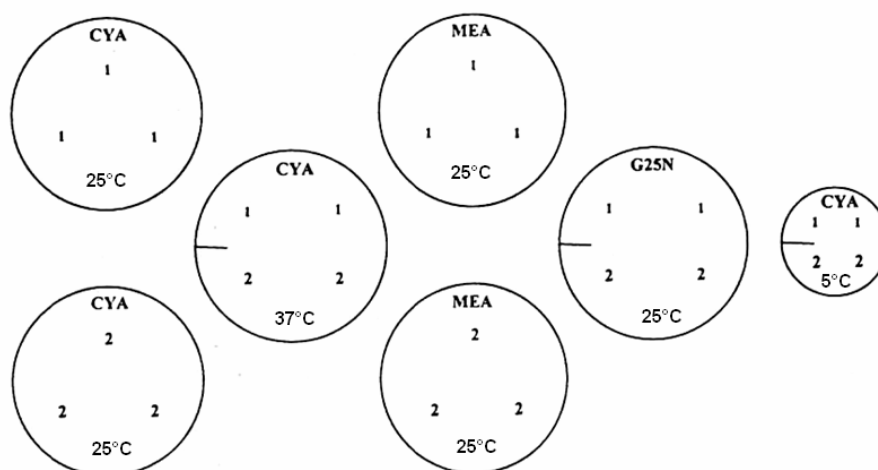


Figure 28 : Schéma de culture des isolats fongiques (souche 1 et 2) destinés à leur identification.

On a fait l'inoculation de deux cultures sur une seule boîte de Pétri de G25N et de CYA à 5°C et de CYA à 37°C. Les cultures s'inhibent rarement sous ces conditions. Néanmoins, la surcroissance d'une culture par rapport à l'autre est observée de temps en temps à 37°C. Généralement les boîtes de Pétri (90-100 millimètres de diamètre) sont utilisées sauf lorsque l'incubation a lieu à 5°C on utilise alors des boîtes plus petites, de 50-60 millimètres de diamètre (Figure 28). La durée de culture est de 7 jours.

Les boîtes incubées à 37°C doivent être enfermées dans des sacs en polyéthylène pour empêcher l'évaporation, donc l'assèchement du milieu. À moins que l'humidité soit très basse, les boîtes à 25°C ne subissent pas d'évaporation excessive en 7 jours.

- Examen des cultures

Pour toutes les cultures obtenues après 7 jours, l'identification est fondée sur la technique de Pitt selon les caractéristiques suivantes (*Pitt et al.*, 1997).

Diamètres de colonie

On mesure les diamètres des colonies macroscopiques en millimètres sur le fond de la boîte. La croissance ou la germination microscopique à 5°C est évaluée par analyse en microscopie à faible grossissement (60-100x), en mettant la boîte de Pétri de 5°C sur le champ optique du microscope et en examinant la lumière transmise.

Caractères de colonie

L'aspect de la colonie est examiné à l'oeil nu ou sous une loupe. L'examen est plus efficace avec un stéréomicroscope. Les rapports optiques dans la gamme de 5x à 25x sont les plus utiles. Des caractères tels que le type, l'endroit de structures conidiogènes et l'étendue de la sporulation sont mesurés avec le stéréomicroscope. La lumière réfléchie est habituellement plus efficace que la lumière transmise. Pour déterminer les couleurs des colonies, on les examine à la lumière du jour ou sous lumière fluorescente. Dans quelques cas, la référence à un dictionnaire de couleur (David, 1995) est utilisée.

Préparation des frottis de moisissures pour la microscopie

Des mycètes sont examinés au microscope en tant que frottis humides. Pour préparer un frottis humide, on utilise une aiguille d'inoculation pour récupérer une petite partie de la colonie comportant les structures conidiogènes. L'échantillon est prélevé sur la bordure de la colonie car les structures fertiles sont jeunes et le nombre de spores n'est pas excessif. De plus, on prend les structures qui peuvent enfermer les spores (cléistothèce), etc., près du centre de la colonie, où la probabilité de trouver des spores à maturité est la plus grande. Les

coupes d'échantillon posées sur une lame sont d'abord « mouillées » avec une goutte d'éthanol de 70%. Quand la majeure partie de l'éthanol s'est évaporée, on ajoute une goutte d'acide lactique (pour la phase ou le système optique de contraste d'interférence) ou un colorant de lactofuchsine pour le champ lumineux, puis on pose une lamelle de couverture. Le liquide en excès est épongé avec une serviette ou un papier absorbant. On procède ensuite à l'examen au microscope.

d. Conservation des mycètes

(Nakasone *et al.*, 2004, Pitt *et al.*, 1997)

Beaucoup de mycètes sont stables, et peuvent être cultivés à plusieurs reprises sans changement apparent ou détérioration. Quelques autres espèces de *Fusarium* et d'espèces pathogènes de plante dégénèrent rapidement après seulement quelques transferts. Pour les isolats stables, le stockage sur des agars de pente est satisfaisant. Beaucoup de mycètes sporogènes survivront librement pendant plusieurs mois et parfois beaucoup plus longtemps, quand ils sont maintenus à 1-4°C sur le CYA. Un des risques du stockage à ces températures est la contamination par *Penicillium psychrophilic* ou par *Cladosporium* sp. Le stockage au congélateur (- 18 à -20°C) empêche une telle contamination, mais certains mycètes ne survivent pas dans ces conditions. Le stockage aux températures ambiantes, à 10°C ou plus, sur une longue durée n'est pas recommandé à cause de l'invasion probable des mites de culture. Dans ce travail, nous avons utilisés la méthode de stockage dans l'eau.

Stockage dans l'eau

Une méthode simple et peu coûteuse de conservation fongique de culture est le stockage des blocs d'agar dans l'eau. Les petits blocs d'agar (7-10 mm carrée) d'une jeune colonie fongique sont prélevés et placés dans de l'eau stérile, dans un flacon avec un bouchon en caoutchouc. Les flacons sont ensuite stockés entre 1° et 10°C. Des cultures peuvent être rétablies en plaçant un bloc dans un milieu approprié de culture. Cette méthode permet de maintenir les caractéristiques de mycètes au moins 7 ans.

2.1.2. Matériels et méthodes

a. Collection d'échantillons

Cinquante échantillons de riz sont obtenus au hasard, de cinq provinces (Quang Nam, Quang Ngai, Binh Dinh, Phu Yen, Nha Trang) de la région centrale du Vietnam. Vingt-cinq échantillons sont collectés en Novembre (le mois le plus pluvieux) et vingt-cinq échantillons en Avril (le mois le moins pluvieux).

b. Examen des moisissures

Enumération

Les échantillons sont examinés par la technique dite 'Direct Plating' décrite par Pitt *et al.*, (1997). Cent grains de riz par échantillon sont désinfectés en surface dans une solution de chlore actif à 0,4% pendant une minute à température ambiante. Puis, ils sont placés directement sur la gélose DG18 et incubés à 25°C pendant 5 à 7 jours. Les souches formées sont conservées dans l'eau distillée à 4°C pour identification ultérieure.

Identification

L'identification des moisissures est effectuée en utilisant un schéma taxonomique basé sur les caractères morphologiques. Des cultures sont obtenues après 7 jours sur trois milieux standard : CYA utilisé à trois températures de 5, 25 et 37°C, MEA à 25 °C et G25N à 25 °C (Pitt *et al.*, 1997).

L'agar AFPA (*Aspergillus flavus* et *parasiticus* Agar) est utilisé pour identifier les *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*. Dans ce milieu, ces souches produisent une couleur jaune orangé apparente à l'envers de la colonie. La gélose de CYA20 (Czapek Yeast Extract Agar avec 20% sucre) est utilisée pour l'identification du genre de *Eurotium* link: Fr. (Pitt *et al.*, 1997)

2.1.3. Résultats et discussion

Cinquante échantillons ont été analysés. Parmi eux, 25 échantillons de la saison des pluies et 25 échantillons de la saison sèche. Les résultats sont présentés dans le tableau 10.

Tous les échantillons analysés sont contaminés par des moisissures. Plusieurs genres sont trouvés. Ce sont principalement des moisissures de stockage (Ominski, 1994) comme *Aspergillus* (84% échantillons), *Penicillium* (78%) et *Eurotium* (68%). Les autres moisissures tels que *Zygomycetes* (16%), moisissures miscellanées (24%) sont aussi détectés. Les moisissures telles que : *Eurotium* (*E. amstelodami*, *E. chevalieri*, *E. repens* et *E. rubrum*) sont détectées mais ne sont pas dangereuses (Pitt *et al.*, 1997).

A. versicolor produit de la stérigmatocystine, toxine cancérigène pour le foie. Néanmoins la stérigmatocystine semble être seulement 150 fois moins toxique que l'aflatoxine B1. Par contre la stérigmatocystine est un précurseur de l'aflatoxine (Pitt *et al.*, 1997). La présence simultanée d'*A. versicolor* et d'*A. parasiticus* (14% d'échantillons) constitue un risque supplémentaire de contamination en AFB1.

La proportion de grains contaminés par des moisissures en saison des pluies (18,68%) est plus élevée qu'en saison sèche (13,48%).

A la saison des pluies, *A. parasiticus* est isolé de 60% des échantillons (2,48% des grains contaminés), *Penicillium citrinum* (54%), *P. implicatum* (42%) et *A. penicillioides* (38%). Les autres moisissures sont relativement moins fréquentes : *A. versicolor* (20%), *A. candidus* (12%), *A. tamarra kita* (10%), *P. restrictum* (8%), *A. restrictus* (6%) et *P. decumbens* (6%). La co-contamination par *A. versicolor* et *A. parasiticus* est de 20%.

En période sèche, *A. parasiticus* est isolé de 28% des échantillons examinés, et seulement 0,56% des grains sont contaminés. Les autres sont présents en faible quantité: *P. restrictum* (8%), *A. restrictus* (4%) et *P. decumbens* (4%). La co-contamination d'*A. versicolor* et d'*A. parasiticus* est de 8%.

Tableau 10 : Evaluation de la quantité et de la nature des moisissures présentes dans 50 échantillons de riz préalablement désinfectés en surface

	Echantillons de la saison sèche				Echantillons de la saison des pluies			
	Grains infectés		Echantillons infectés		Grains infectés		Echantillons infectés	
	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%
Moisissures miscellanées	10	0,4	6	24	12	0,48	6	24
<i>Zygomycetes</i>	6	0,24	4	16	8	0,32	4	16
<i>Eurotium spp.</i>	90	3,6	15	60	133	5,32	19	76
<i>Aspergillus spp.</i>	114	4,56	22	88	167	6,68	20	80
<i>A. penicillioides</i>	78	3,12	10	40	69	2,76	9	36
<i>A. restrictus</i>	5	0,2	1	4	10	0,4	2	8
<i>A. parasiticus</i>	14	0,56	7	28	62	2,48	15	60
<i>A. candidus</i>	3	0,12	2	8	13	0,52	4	16
<i>A. versicolor</i>	8	0,32	5	20	8	0,32	5	20
<i>A. tamarri kita</i>	4	0,16	3	12	2	0,08	2	8
<i>A. niger</i>	2	0,08	2	8	3	0,12	2	8
<i>Penicillium spp.</i>	117	4,68	19	76	147	5,88	20	80
<i>P. citrinum</i>	56	2,24	14	56	48	1,92	13	52
<i>P. restrictum</i>	4	0,16	2	8	8	0,32	2	8
<i>P. decumbens</i>	8	0,32	1	4	24	0,96	2	8
<i>P. implicatum</i>	49	1,96	11	44	67	2,68	10	40
Total	337	13,48	25	100	467	18,68	25	100

2.2. Des souches productrices des mycotoxines : AFB1, CIT et OTA

2.2.1. Points concernant la sélection des souches productrices des mycotoxines

Comme présenté dans la partie généralités, quelques moisissures sont capables de produire plus d'une mycotoxine et quelques mycotoxines sont produites par plus d'une espèce fongique. Il y a plusieurs facteurs qui affectent la formation de mycotoxines. Ceci représente une difficulté pour déterminer toutes les moisissures productrices de mycotoxines dans les échantillons. Le travail réalisé a consisté à sélectionner des souches productrices des mycotoxines. Pour chaque espèce, dix souches ont été choisies au hasard pour analyse de l'AFB1, la CIT et l'OTA.

Le milieu CYA a généralement été utilisé pour tester la production des souches isolées. Le milieu CA est spécialement utilisé pour l'AFB1 (Lin *et al.*, 1976, Davis *et al.*, 1987, Abarca *et al.*, 1994, Dyer *et al.*, 1994). Le milieu YES est spécialement utilisé pour l'OTA.

L'AF est produite par trois espèces d'*Aspergillus* connues. Ce sont *A. flavus*, *A. parasiticus*, et *A. nomius*. La CIT est produite de *Penicillium citrinum*. Elle est aussi produite par d'autres espèces de *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. nordicum*, etc.), des *Aspergillii* (*A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*, etc., capable de produire aussi l'OTA) et *Monascus*.

L'AFB1 la CIT et l'OTA sont des substances fortement fluorescentes. Donc, la détection par fluorescence de colonies permet de trier uniquement des souches productrices AFB1, CIT et OTA, et puis d'analyser les mycotoxines par HPLC.

2.2.2. Matériels et Méthodes

a. Matériels

Les milieux DG18, MEA, CYA, CA et YES sont utilisés. Les compositions sont présentées dans l'annexe.

b. Les souches

Les souches isolées sont présentées dans le tableau 10 (page 83)

c. Méthode d'analyse des mycotoxines : AFB1, CIT et l'OTA

Extraction des mycotoxines

Les souches sont cultivées sur les milieux gélosés DG18, MEA, CYA et CA 25°C et 30°C pendant 7 jours, la fluorescence émise sous l'UV est détectée (Lin *et al.*, 1976, Davis *et al.*, 1987, Abarca *et al.*, 1994, Dyer *et al.*, 1994). Les toxines : AFB1, CIT et OTA sont extraites à partir d'une colonie et purifiées pour analyse en HPLC.

Les mycotoxines sont extraites avec 30 mL d'une solution « acétonitrile – solution de chlorure de potassium 4% (9 :1) à pH 1,5 » à partir d'une colonie par gélose. Le mélange est agité sur un agitateur orbital pendant 20 minutes. Ensuite, l'extrait est filtré sous vide sur papier Whatman No. 4.

Purification

Le filtrat obtenu est lavé à l'hexane (2x 30 mL). L'eau déminéralisée (30 mL) y est ajoutée. Cette solution est extraite par le chloroforme trois fois (30 mL puis 2x20mL). Tous les extraits chloroformiques sont regroupés puis évaporés sous vide dans un évaporateur rotatif à 40°C. Le résidu est repris dans le méthanol (2 mL), soniqué puis filtré à travers un filtre de 0,45µm, puis évaporé à sec sous azote. L'extrait sera finalement dissous dans le méthanol.

Quantification sur HPLC

Les conditions d'HPLC sont présentées au dessus (page 63, point c)

2.2.3. Résultats et discussion

a. Des souches productrices d'AFB1

Toutes les souches d'*A. parasiticus* isolées du milieu gélosé CA incubé à 30°C pendant 7 jours, sont détectées par la fluorescence émise sous la lumière d'ultraviolet (Figure 29).

Dix souches de *A. parasiticus* sont choisies au hasard pour évaluer la production d'AFB1 (figure 30). Elles produisent approximativement 40 µg d'AFB1/g de milieu.

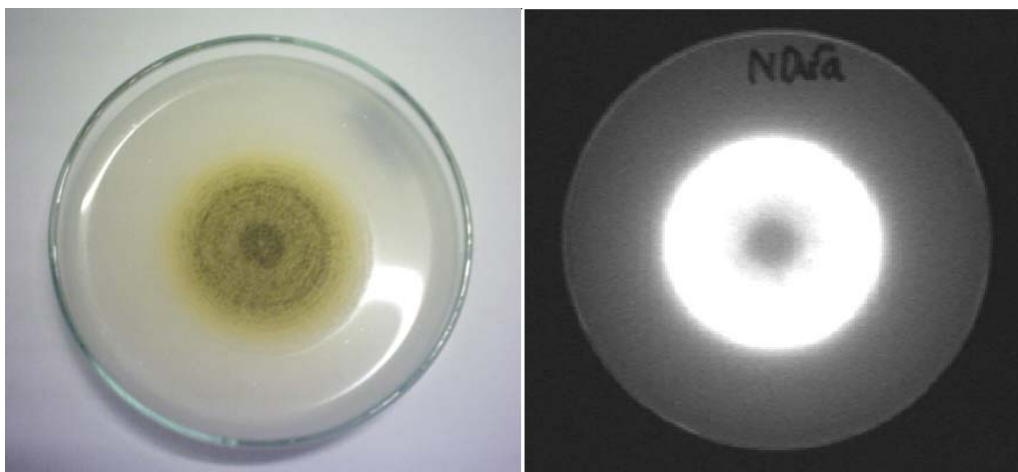


Figure 29 : Colonie d' *A. parasiticus* sur CA à 30°C après 7 jours (gauche) et sa fluorescence sous l'UV (droite).

Il en est de même pour les souches de *P. citrinum*. Parmi les milieux de culture utilisés CYA est le meilleur. La concentration d'AFB1 produite par des souches de *P. citrinum* est plus basse que celle des souches d'*A. parasiticus* (approximativement 0,5 µg d'AFB1/g de milieu).

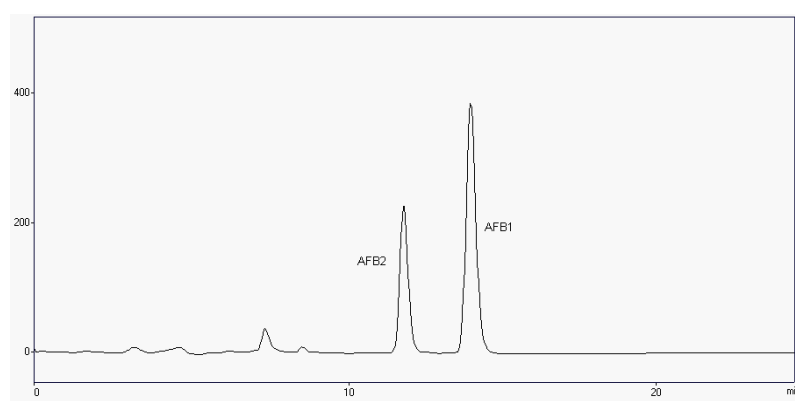


Figure 30 : Chromatogramme des AFB1 et B2 isolées du milieu CA ayant servi à la culture d'*A. parasiticus*

b. Des souches productrices de CIT

Toutes les souches de *P. citrinum* sont cultivées sur les milieux DG18, MEA, CYA, et CA et détectées par fluorescence sous UV (Figure 31). Sur la gélose CA, le diamètre de colonie de *P. citrinum* est grand (environ 18 mm) et la

fluorescence autour de sa colonie est importante. Ainsi, CA convient mieux pour la détection par la fluorescence.

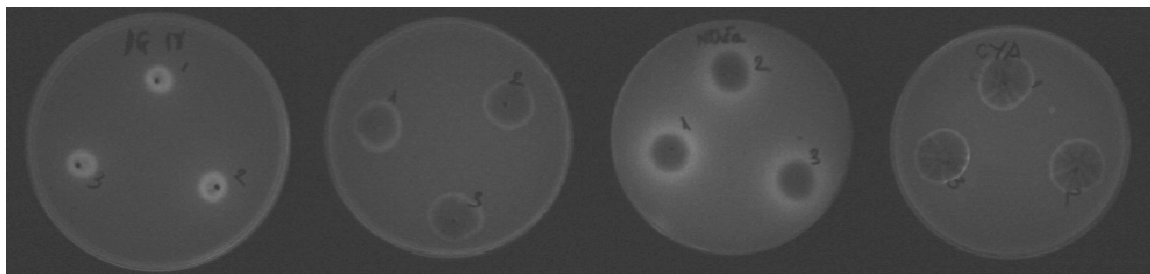


Figure 31 : Fluorescence sous la lumière d'ultraviolet de la colonie de *P. citrinum* sur DG18, MEA, CA et CYA (de gauche à droite).

Les souches : *P. citrinum*, *A. niger*, *A. parasiticus* produisent de la CIT. Les teneurs de CIT trouvées sont de 70000 ng (*P. citrinum*- Figure 32), 50 ng (*A. niger*), 15 ng (*A. parasiticus*) par g de milieu de culture.

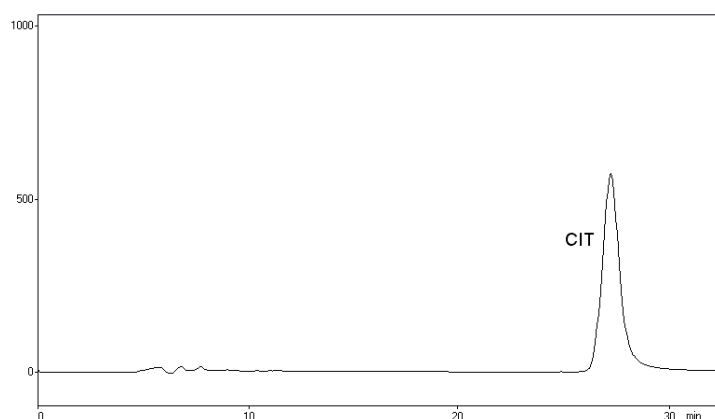


Figure 32: Chromatogramme de CIT extrait du milieu de CA ayant permis la culture de *P. citrinum*

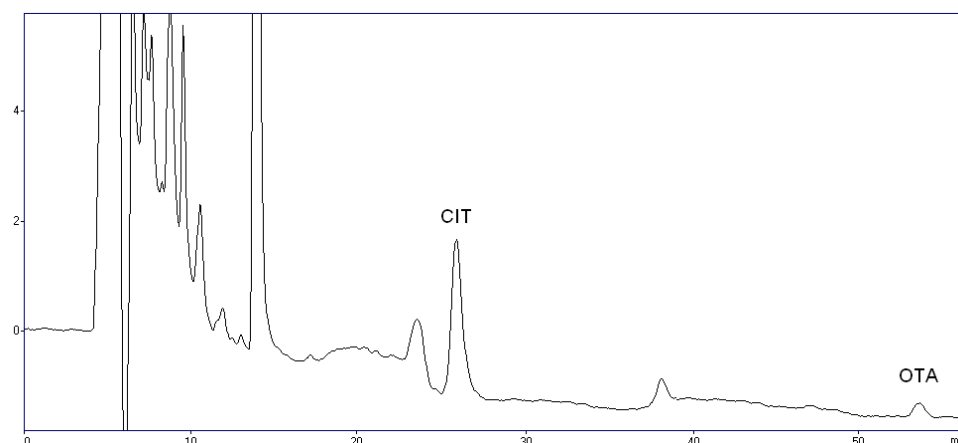


Figure 33 : Chromatogramme de CIT et OTA extrait du milieu CYA ayant permis culture d' *A. niger*

c. Des souches productrices d'OTA

Les CYA et CA sont les meilleurs milieux de culture pour *A. niger*. La fluorescence des colonies de 5 souches de *A. niger* sur les milieux CYA, CA, DG18 et YES n'est pas détectée.

Trois des cinq souches d'*A. niger* isolées sont productrices d'OTA (Figure 33). Mais la production d'OTA est relativement faible (moins de 1 ng/g de milieu).

Nous n'avons pas isolé de souches connues comme productrices d'OTA comme *A. ochraceus*, *P. viridicatum*, des échantillons contaminés par l'OTA.

Comme le climat du Vietnam est tropical et que les conditions de stockage du riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam sont mauvaises, la saison des pluies affecte grandement la qualité du riz en raison des taux de contamination de moisissures élevés en cette période. Des souches d'*A. parasiticus* productrices d'AFB1, sont isolées de 60% des échantillons collectés lors de la saison des pluies. Les souches : *P. citrinum* et *A. niger*, productrices de CIT, contaminent le riz respectivement de 50% et 7% des échantillons analysés. Certaines souches de *A. niger* identifiées sécrètent l'OTA. Les mycotoxines AFB1, CIT, OTA sont hautement toxiques pour l'homme si bien que la présence de telles souches présente un danger potentiel pour les consommateurs. Il serait

intéressant de définir de meilleures conditions de stockage en vue de réduire ces contaminations du riz commercialisé dans ces régions.

3. Seuil minimal de l'activité de l'eau pour la production des mycotoxines sur le riz. Proposition des conditions de conservation du riz dans un climat tropical

Il y a plusieurs facteurs qui affectent la formation des mycotoxines. Deux facteurs le plus importants sont l'humidité et la température. Pour le riz commercialisé au Vietnam, le stockage du riz à basse température n'est pas économiquement possible. Donc, nous ne pouvons pas jouer sur la température. On s'est alors consacré aux effets de la teneur en eau du riz sur la production de mycotoxines.

Comme on a l'abordé au paravant, le riz, commercialisé sur les marchés au Vietnam sans emballage adéquat, peut absorber de l'eau dans l'air. Ce qui laisse penser que l'humidité de l'air influencera la production de mycotoxines dans le riz.

Et ainsi grâce aux résultats, on peut définir le seuil minimal de l' a_w pour la production ces mycotoxines.

3.1. Effet de l'humidité de l'air à la température de 25/30°C sur la production d'aflatoxine B1 par *Aspergillus parasiticus* dans le riz.

3.1.1. Matériels et méthodes

a. Produits chimiques

NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KCl, BaCl_2 sont de qualité « pour analyse ».

Le riz utilisé ne contient pas d'AFB1 et possède une a_w de 0,734 pour une teneur en eau de 13 %.

b. Moisissures

Des souches d'*A. parasiticus* mycotoxinogénique utilisées dans cette étude sont isolées à partir des échantillons de riz collectés et étudiés dans ce travail.

c. Humidité relative de l'air

Les conditions d'humidité relative de l'air (HR) de 75, 79, 85, 90 % sont créées respectivement à partir de solutions saturées de NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KCl, BaCl_2 . (Rockland, 1960 ; Adams *et al.*, 2002).

d. Activité de l'eau

L'activité de l'eau est mesurée à l'aide d'un hygromètre électronique, modèle Hygrolab 3 w/o 39746, Votronic instrument Corp, Suisse (Figure 34).



Figure 34 : Hygromètre électronique

e. Teneur en eau

La teneur en eau est mesurée par déshydratation du riz à 130°C selon le protocole suivant :

Le riz (environ 10 g) dont le poids est déterminé avec une balance de précision, est soumis à une déshydratation pendant 2 heures dans un four à 130 $\pm 3^\circ\text{C}$. Il est conservé dans un dessiccateur. Dès que la température revient à la température ambiante, son poids est déterminé. La différence de poids permet de calculer la teneur en eau.

f. Production d'*A. parasiticus*. Conditions d'expérimentation.

Une suspension de spores (dans solution de NaCl 0,85% et Tween 80 0,1%) est préparée à partir d'une colonie sur le milieu CYA à 25°C après 7 jour de culture.

Vingt grammes de riz sont inoculés par 10^4 spores d'*A. parasiticus*. Elles sont exposées à des atmosphères dont l'HR est variable (75, 79, 85, 90 %) à 25 et 30°C.

Un témoin est réalisé sur du riz conservé en bouteille de verre.

Le riz est exposé à ces atmosphères à des températures de 25 et 30°C. En fonction du temps, l'activité de l'eau et la teneur en eau sont déterminées.

Une quantité de riz est prélevée toutes les deux semaines pour doser sa teneur en AFB1 selon la méthode au-dessus (à la page 64, partie 1.1.3.) jusqu'à ce que l'AFB1 soit quantifiables.

Chaque test est répété deux fois. Les valeurs moyennes sont comparées.

3.1.2. Résultats et discussion

a. Variation de l'activité de l'eau et de la teneur en eau du riz pendant le stockage.

Le riz dont l' a_w est égale à 0,734 est directement exposé à de l'air humide d'HR variable. L' a_w et la teneur en eau au cours du stockage sont présentés dans le tableau 11 et la figure 35.

Le riz absorbe l'eau de l'air si bien que sa teneur en eau et l'activité de l'eau augmentent. Après exposition de 2 semaines à une HR de 75% l' a_w atteint 0,751 et la teneur en eau 13,37%. Sous une HR de 79%, après 2 semaines, l' a_w du riz est de 0,78 et la teneur en eau de 13,8%. Après 2 semaines on constate qu'une exposition à une HR de 75% et 79% le riz atteint un a_w relativement voisin de l'HR que le riz est exposé. Une exposition plus longue ne modifie pas l' a_w . Après exposition à une HR de 85% et de 90% l' a_w augmente progressivement. Pour une HR de 85% l' a_w max de 0,819 est atteint au bout de 4 semaines, alors que pour une HR de 90% un plateau d' a_w de 0,875 est atteint au bout de 8 semaines. Néanmoins dès deux semaines d'exposition à ces deux HR, l' a_w a considérablement augmenté et est supérieur à ceux observés dans les deux autres conditions d'HR. Après exposition à une HR de 75%, le taux en eau est inférieur à 14%. Pour les fortes HR, le taux en eau du riz dépasse 17%.

Tableau 11: Variation de l' a_w du riz exposé au cours du stockage en fonction de l'humidité relative à une température de 25°C ou 30°C

Temps (semaine)	HR 75%		HR 79%		HR 85%		HR 90%	
	Teneur en eau (%)	a_w	Teneur en eau (%)	a_w	Teneur en eau (%)	a_w	Teneur en eau (%)	a_w
0	12,98	0,734	12,98	0,734	12,98	0,734	12,98	0,734
2	13,37	0,751	13,80	0,778	14,21	0,799	15,06	0,824
4	13,39	0,753	14,09	0,792	14,75	0,819	15,83	0,864
6	13,45	0,759	14,24	0,789	14,93	0,817	16,48	0,863
8	13,51	0,750	14,30	0,783	14,98	0,81	16,84	0,875
10	13,54	0,754	14,31	0,789	15,09	0,816	17,09	0,872
12	13,51	0,745	14,30	0,781	15,12	0,813	17,11	0,869
14	13,50	0,75	14,31	0,785	15,12	0,818	17,13	0,874

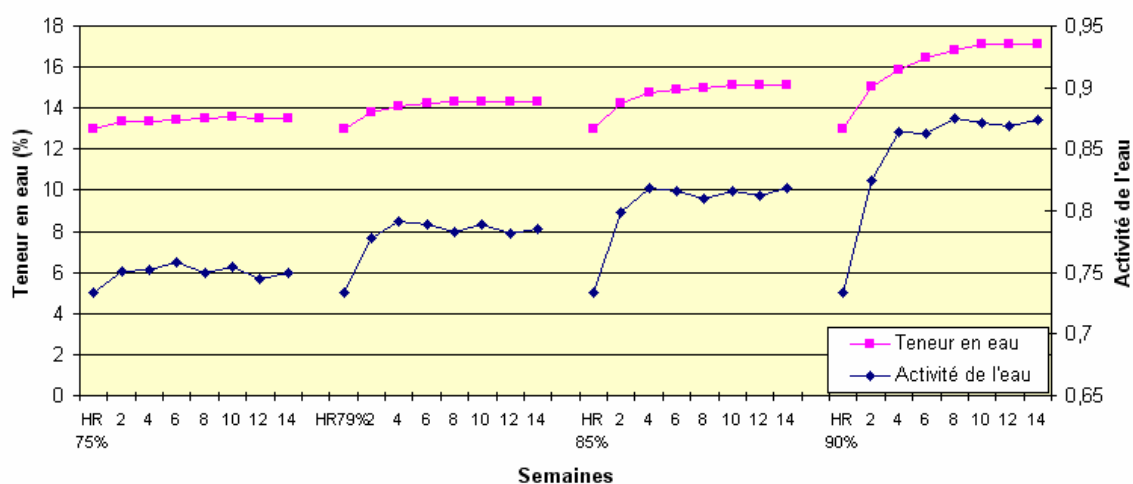


Figure 35 : Variation de l' a_w et de la teneur en eau du riz pendant le stockage en fonction de l'HR.

Les mêmes résultats sont obtenus une température de 30°C.

b. Production d'aflatoxine B1

Toutes les deux semaines, 20g de chaque échantillon sont prélevés et la quantité d'AFB1 produite est déterminée dès lors que l'AFB1 est quantifiable. Les résultats sont présentés dans le tableau 12 et la figure 36.

Tableau 12: Quantité d'AFB1 (ng/g) produite dans le riz en fonction de différentes conditions de stockage.

Temps (semaine)	Contrôle		RH 75%		RH 79%		RH 85%		RH 90%	
	25°C	30°C	25°C	30°C	25°C	30°C	25°C	30°C	25°C	30°C
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	2,28	0,08
6	0	0	0	0	0	0	0	1,25	2,48	2,77
8	0	0	0	0	0	0	0			
10	0	0	0	0,12	0	0,12	0,33			
12	0	0	0,13	0,21	0,11	0,26	0,54			
14	0	0	0,19		0,21					

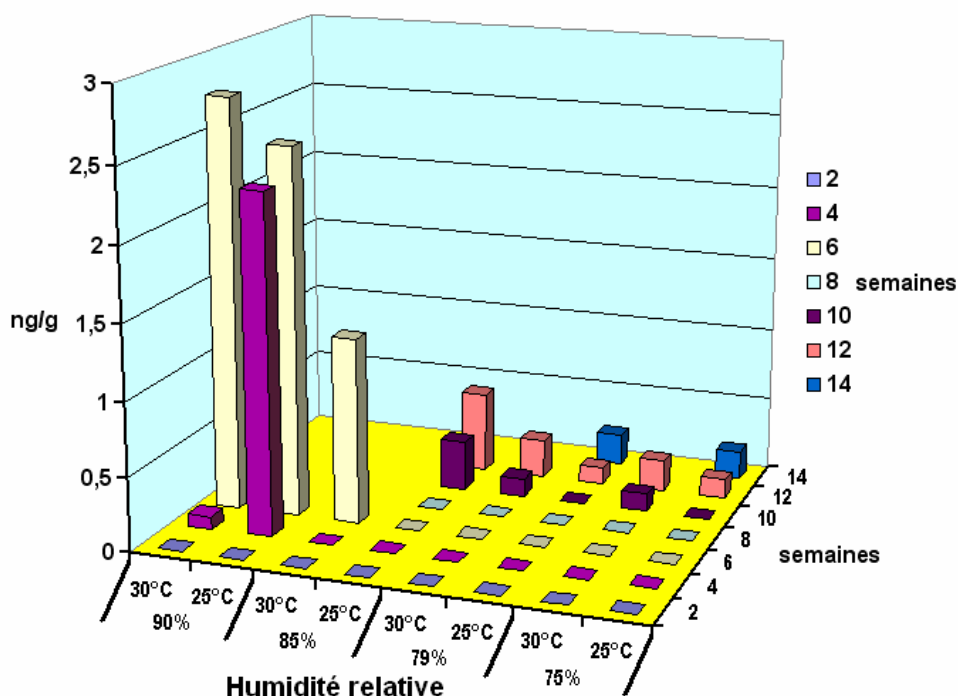


Figure 36 : AFB1 (ng/g) dans le riz stocké dans différentes conditions.

On remarque que l'AFB1 est détectée dans le riz après 4 semaines à une HR de 90%. A une HR de 85%, l'AFB1 n'est détectée qu'après 6 semaines à 30°C, et 10 semaines à 25°C. Même lors d'une exposition à une HR de 75%, de l'AFB1 est produite après 10 semaines si la température est de 30°C et après 12 semaines si la température est de 25°C. L'AFB1 n'est pas détectée dans les échantillons témoins.

L'activité de l'eau la plus faible du riz contaminé par l'AFB1 est de 0,75 (tableau 12). La teneur en AFB1 est très faible (<LOQ de 0,22 ng/g de riz) après un temps long (10-12 semaines).

Selon Bresler (1998), le seuil minimal de l' a_w sur l'amarante est plus élevé (0,825) ; mais il faut signaler que la teneur d'AFB1 est plus élevée (7,5 ppb) et après un temps court (7 jours).

L'effet de l' a_w à la température de 25/30°C sur la production d'AFB1 a été réalisé sur un milieu semi- synthétique (et non directement sur le riz) (présenté à la page 21, point 3.2.). Ceci ne reflète pas exactement la réalité. Néanmoins les conditions de cette expérience sont proches des conditions climatiques réelles du Vietnam. Ces résultats peuvent être mis à profit pour déterminer des conditions de stockage.

3.2. L'effet de l'humidité de l'air et des températures de 25/30°C sur la production de citrinine par *Penicillium citrinum* dans le riz.

Le protocole est réalisé de même façon que pour *A. parasiticus* (à la page 89, point 3.1.)

Le résultat est présenté dans le tableau 13 et figure 37.

Tableau 13 : Quantité de Citrinine (ng/g) produite dans le riz en fonction des différentes conditions de stockage

Temps (semaine)	Contrôle		RH75%		RH79%		RH85%		RH90%	
	25°C	30°C	25°C	30°C	25°C	30°C	25°C	30°C	25°C	30°C
2	0	0	0	0	0	LOQ	LOQ	0	0	LOQ
4	0	0	0	0	0	0,19	0,28	LOQ	0	LOQ
6	0	0	0	0	0	0,17	0,24	0,19	0,52	0,33
8	0	0	0,29	0,54	0,24	0,22	0,98	0,18	0,78	0,69
10	0	0	0,24	0,24	1,34	0,67	0,73	0,58		0,86
12	0	0	1,06	0,8						

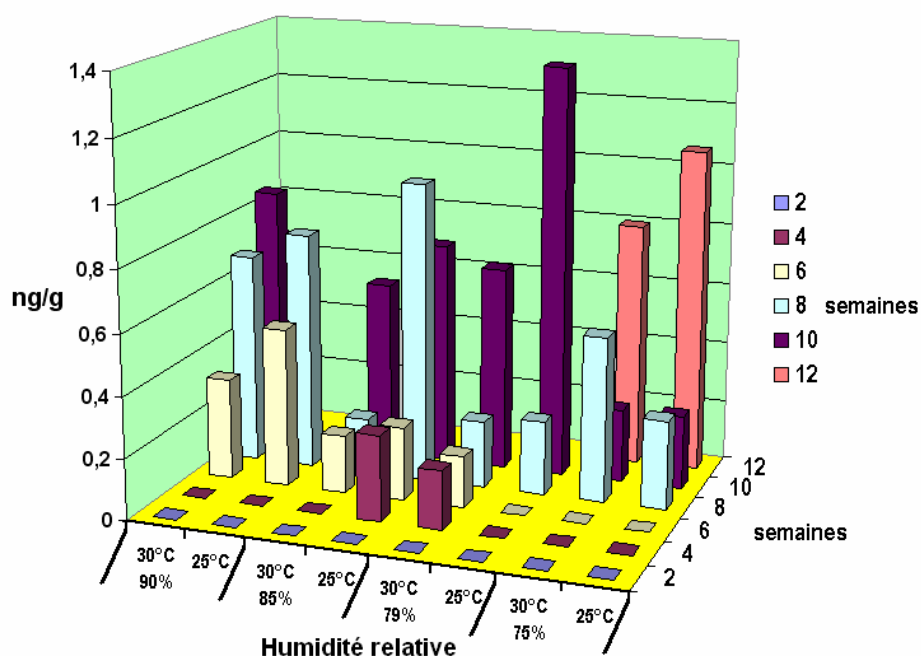


Figure 37 : Quantité de citrinine (ng/g) dans le riz en fonction des différentes conditions de stockage.

On remarque que la CIT est détectée dans le riz après 4 semaines à une HR de 79% (à 30°C) et 85% (à 25°C). A une HR de 75%, la CIT n'est détectée qu'après 8 semaines à 25°C et 30°C. Il est important de noter que même à une HR de 75 %, après 12 semaines, la teneur en CIT atteint 1 ng/g.

3.3. L'effet de l'humidité de l'air et des températures de 25/30°C sur la production d'ochratoxine A par *Aspergillus niger* dans le riz.

L'expérimentation est exécutée comme précédemment (à la page 88, point 3.1.)

Le résultat est présenté dans le tableau 14.

Après 4 semaines, l'OTA est détectée dans le riz, mais à une concentration inférieure à la LOQ. Même après 3 mois très peu d'OTA est formée. La teneur en OTA dans les échantillons n'était pourtant pas négligeable puisqu'elle pouvait atteindre 2,78ng /g de riz. Ceci suggère que les souches isolées ne sont pas majoritairement responsables de la contamination d'OTA dans les échantillons de riz. Il se peut aussi que ce soit la présence simultanée de moisissures qui engendrent cette formation, comme cela a été montré dans le blé (Molinié, 2004)

Tableau 14 : Quantité d'Ochratoxine A (ng/g) produite dans le riz en fonction de différentes conditions de stockage.

Temps (semaine)	Contrôle		RH 75%		RH 79%		RH 85%		RH 90%	
	25°C	30°C	25°C	30°C	25°C	30°C	25°C	30°C	25°C	30°C
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	<LOD	±	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	±	±
6	0	0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	±	±
8	0	0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	±	±
10	0	0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0
12	0	0	<LOQ	<LOD	±	<LOD	<LOD	±	<LOD	0

3.4. Seuil minimal de l'activité de l'eau pour la production des mycotoxines sur le riz.

3.4.1. Relation entre l'activité de l'eau et teneur en eau :

- Matériels et méthodes

Echantillonnage

Vingt neuf échantillons de riz (500 g) ont été prélevés sur les marchés.

Activité de l'eau et teneur en eau :

La mesure l'activité de l'eau et la teneur en eau est présentée à la page 90, point 3.1.1.

- Résultats :

Le résultat est présenté sur la figure 38. Il y a une relation entre l'activité de l'eau et la teneur en eau de riz.

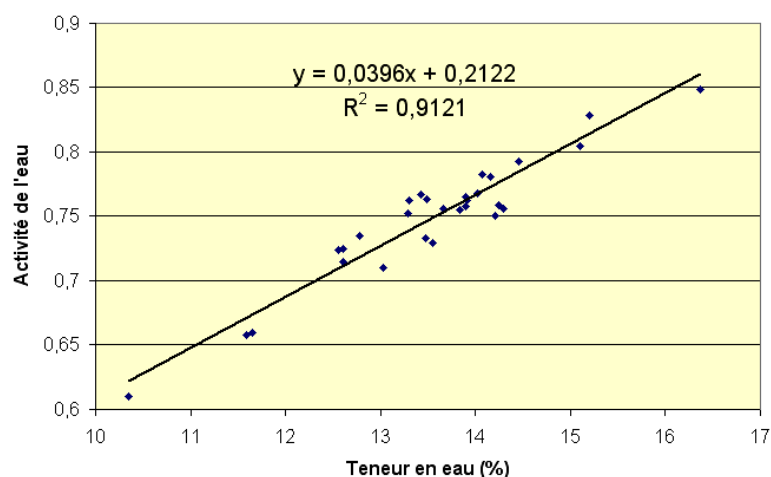


Figure 38 : Relation entre l'activité de l'eau et la teneur en eau.

3.4.2. Seuil minimal de l'activité de l'eau (et la teneur en eau correspondante) pour la production des mycotoxines sur le riz.

D'après les résultats présentés au dessus (point 3.1, 3.2, 3.3), on s'aperçoit que le riz absorbe l'eau de l'air humide, donc sa teneur en eau et l'activité de l'eau augmentent. Des moisissures se sont développées et ont produit des mycotoxines. A une HR de 75%, l'activité de l'eau du riz atteint approximativement 0,75 (correspondant à la teneur en eau de 13,6%, Figure

35) ; ces mycotoxines sont détectées à un niveau inférieur à la LOQ. Dans le riz contrôle (dont l' a_w de 0,734 et la teneur en eau de 13%), l'AFB1, la CIT et l'OTA ne sont pas détectées. Le seuil minimal de l'activité de l'eau pour la production de ces mycotoxines sur le riz est compris entre 0.734 et 0.75 (correspondant à une teneur en eau comprise entre 13 et 13,6%) (à température de 25/30°C).

3.5. Détermination des conditions pour la conservation du riz

Pour être conservé dans de bonnes conditions le riz doit avoir une activité en eau inférieure à 0,75 et il faut empêcher l'absorption de l'eau contenue dans l'air humide. Une manière simple est l'utilisation d'un sac en polyéthylène.

a. Matériels et méthodes

Le riz sans mycotoxine, dont la teneur en eau est de 13% et l' a_w de 0,73 a été utilisé. Les sacs de polyéthylène (calibre 0,08 mm) sont fournis par la compagnie 'BAO BI SAI GON' à HCM ville.

Les méthodes pour contaminer des souches fongiques et l'analyse des mycotoxines (AFB1, CIT et OTA) ont été décrites plus haut (aux pages 64 et 90).

Le scellage est exécuté par la scelleuse de Tecnovac-5100A-25M3H, Italie (Figure 39)



Figure 39 : Scelleuse

b. Résultats

Le riz inoculé ou non avec des souches de moisissures toxigènes a été stocké dans des sacs de polyéthylène sous vide de 90% et non sous vide, à des températures de 25°C ou 30°C. Chaque mois, les mycotoxines ont été analysées.

Dans ces conditions aucune des mycotoxines (AFB1, CIT, OTA) n'a été détectée après 10 mois de conservation.

CONCLUSION GENERALE

La contamination de ces mycotoxines dans le riz décortiqué commercialisé dans de grands marchés des cinq provinces (Quang nam, Quang ngai, Binh dinh, Phu yen et Nha trang) de la région centrale du Vietnam est préoccupante. D'une manière générale, le riz est fortement contaminé en AFB1, ainsi qu'en OTA pour certains échantillons. La contamination en CIT est insignifiante.

Le niveau de contamination du riz en mycotoxine est fortement affecté par la saison, notamment la saison des pluies constitue un facteur de risque favorisant le développement de l'AFB1 et de la CIT. De plus, la coexistence de la CIT avec l'AFB1 et ou l'OTA parfois à des taux élevés doit être prise en considération.

La proportion de grains contaminés par les moisissures à la saison des pluies (18,7%) est plus élevée qu'en saison sèche (13,5%). Des moisissures de stockage des genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Eurotium* sont dominantes dans tous les échantillons examinés. Lors de la saison des pluies, la proportion d'échantillons contaminés par *A. parasiticus* est élevée (60%). Sur cinquante échantillons, plus de la moitié (54%) des échantillons sont contaminés par *P. citrinum*, et 7% sont contaminés par *A. niger*; 14% sont contaminés simultanément par *A. versicolor* et *A. parasiticus*.

Après 4 semaines, à l'humidité relative de l'air (HR) de 90%, l'AFB1 est détectée. A l'HR de 75% (l'activité de l'eau du riz correspondant est approximatif 0,75), après 8-10 semaines, AFB1, CIT et OTA sont détectées.

En utilisant des sacs en polyéthylène qui réduisent réellement le contact direct entre le riz (à vendre au marché) et l'humidité de l'air, on pourrait conserver assez efficacement le riz, dont la teneur en eau est de 13% ou moins (ou l'activité de l'eau de 0,734 ou moins), de la contamination par les mycotoxines. Ceci même pour le riz dont la contamination a été provoquée par des spores de souches mycotoxinogéniques.

PERSPECTIVES ET PROPOSITIONS

Au Vietnam, le riz est l'aliment de base. La consommation quotidienne est très élevée. Donc, la présence de mycotoxines dans le riz est une question très importante. Certains auteurs ont rapporté un taux élevé de contaminations par des mycotoxines. Mais cependant ces résultats n'ont pas attiré l'attention des autorités, vendeurs et consommateurs, en particulier pour le riz localement commercialisé. Les résultats de ce travail seraient peut-être une alerte sur la contamination par les mycotoxines dans le riz des régions chaudes et humides.

La méthode d'analyse simultanée de trois mycotoxines : aflatoxine B1, citrinine et ochratoxine A permettrait donc de réduire le coût d'analyse de ces toxines. Elle faciliterait la veille de leur présence dans le riz, et peut-être dans les autres aliments. Il serait donc intéressant de mettre au point cette méthode d'analyse pour les autres mycotoxines, dans d'autres denrées alimentaires.

En utilisant des sacs en polyéthylène qui réduisent réellement le contact direct entre le riz (à vendre au marché) et l'humidité de l'air, on pourrait protéger assez efficacement le riz, dont la teneur en eau est égale ou inférieure à 13% (ou $a_w \leq 0,734$), de la contamination par les mycotoxines, même malgré la présence de spores de moisissures. Cette méthode est basique et applicable pour le riz localement commercialisé.

Il est nécessaire de faire des études plus poussées de la contamination par d'autres mycotoxines dans le riz au cours du stockage, ainsi que la contamination par les mycotoxines avant et pendant la récolte et au cours du séchage (spécialement pour l'OTA).

Une enquête sur les maladie de cancer du foie ou des reins dans ces régions est préconisée afin d'évaluer l'impact de ces contaminations de mycotoxines sur la santé de la population.

Références et Annexe

REFERENCES

1. **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.
2. **Abbas, H.K., Williams, W.B., Windham, G.L., Pringle, H.C., Xi, W. & Shier, W.T. (2002)** Aflatoxin and fumosin contamination of commercial corn (*Zea mays*) hybrids in Mississippi. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. **50** (18): 5246-5254.
3. **Abdel-Kader, M.I.A., Moubasher, A.H., Abdel-Hafez, S.I.I., (1979)** Survey of the mycoflora of barley grains in Egypt. *Mycopathologia*, **69**: 143-147.
4. **Abdel-Azim, O.Z. & Khalil, I.I. (1979)** Studies on storage moulds in Egypt. III. Deterioration and discoloration of rice grains. *Agriculture Research Review*, **57**: 79-94.
5. **Abdel-Hafez, S.I.I., EL-Kady, I.A., Mazen, M.B. & El-Maghraby, A.D. (1987)** Mycoflora and trichothécènes toxins of paddy grains from Egypt. *Mycopathologia*, **100** : 103-112.
6. **Abramson, D., Hulasare, R., White, N.D.G., Jayas, D.S. & Marquardt, R.R., (1999)** Mycotoxin formation in hullless barley during granary storage at 15 and 19% moisture content. *Journal of Stored Products Research*, **35** (3) : 297–305.
7. **Adams, M.R. & Moss, M.O. (2002)** Toxingenic fungi. In “Food microbiology”. RSC, UK, 282-301.
8. **Allcroft, R. & Carnaghan, R.B.A. (1963)** Groundnut toxicity: an examination for toxin in human food products from animal fed toxic groundnut meal. *Vetérinaire Recherche*, **75**: 259-263.
9. **Andrellos, P.J., Beckwith, A.C., Epply, R.M. (1987)** Photochemical changes of Aflatoxin B1, *Journal of the association of official Analytical Chemistry*, **5** : 346-348.

10. **Andrews, S. (1996)** Evaluation of surface disinfection procedures for enumerating fungi in foods: a collaborative study. *International Journal of Food Microbiology*, **29** (2-3): 177-184.
11. **Arai, M. & Hibino, T. (1983)** Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats. *Cancer Letter*, **17**:281–287.
12. **Aziz, N.H. & Moussa, L.A.A. (2002)** Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. *Food Control*, **13** (4-5) : 281–288.
13. **Bennett, J.W. & Klich, M. (2003)** Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review* .**16** : 497-516.
14. **Blanc, P.J., Laussac, J.P., Le, J.B., Le, B.P., Loret, M.O., Pareilleux, A., Prome, D., Prome, J.C., Santerre, A.L. & Goma, G. (1995a)** Characterisation of monascidin A from *Monascus* as citrinin. *International Journal of Food Microbiology* **27**: 201–213.
15. **Blanc, P.J., Loret, M.O. & Goma, G., (1995b)** Production of citrinin by various species of *Monascus*, *Biotechnology Letters* **17** (3) : 291.
16. **Blount, W.P. (1960)** A new turkey disease problem in England characterized by heavy mortality. *Quarterly Poultry Bulletin*, **27** : 1-3.
17. **Bresler, G., Vaamonde, G., Degrossi, C., Pinto, V. F. (1998)** Amaranth grain as substrate for aflatoxin and zearalenone production at different water activity levels, *International Journal of Food Microbiology*, **42**: 57–61.
18. **Bruinink, A., Rasonyi, T. & Sidler, C. (1997)** Reduction of ochratoxin A toxicity by heatinduced epimerization. In vitro effects of ochratoxins on embryonic chick meningeal and other cell cultures. *Toxicology* **118**: 205-210.
19. **Butler, M. J. & Day, A. W. (1998)** Fungal melanins: a review. *Canadien Journal Microbiology*, **44**: 1115-1136.
20. **Cahagnier, B., Dragacc, S., Frayssinet, C., J.M. Frémy, Hennebert, G.L., Lesage-meessen, L., Multon, J.L., Richard-Molard, D. &**

- Roquebert, M.F. (1998)** Moisissures des aliments peu hydratés. *Lavoisier Tec&Doc*, France.
21. **Carlile, M. J. & Watkinson, S. C. (1997)** The fungi. *Academic Press*, San diego. CA.
 22. **Castegnaro, M., Canadas, D., Vrabcheva, T., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N., Pfohl-Leszkowicz, A. (2006).** Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxin A through biomarkers. *Molecular Nutrition Food Research*, **50**: 519-529.
 23. **Castegnaro M., Barek J., Jacob J., Kirso U., Lafontaine E.B., Sansone E.B., Telling, G.M. & Vu Duc M. (1991)** Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory wastes: Some mycotoxins. *IARC Scientific Publications* 113.
 24. **Castegnaro, M. (1999)** Risques cancérogènes - Les aflatoxine. Dans "Les mycotoxines dans l'alimentation: evaluation et gestion du risque" de conseil supérieur d'hygiène publique de France. *Technique et Documentation*, Paris.
 25. **Chandra, R. & Sarbhoy, A.K. (1997)** Production of aflatoxins and zearalenone by the toxigenic fungal isolates obtained from stored food grains of commercial crops. *Indian Phytopathology* **50**: 458–468.
 26. **Chapeland- Leclerc, F., Papon N., Noël T. & Villard J. (2005)** Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoses). *Revue Française des Laboratoires*, 373.
 27. **Cole, R.J, Schweikert, M.A. (2003a)** Handbook of secondary fungal metabolites. *Academic Press (Elsevier Science)*, USA, Volume I: 547-569.
 28. **Cole, R.J, Jarvis, B.B., Schweikert, M.A. (2003b)** Handbook of secondary fungal metabolites. *Academic Press (Elsevier Science)*, USA, Volume III: 615-624.
 29. **Comerio, R., Fernandez Pinto, V.E. & Vaamonde, G. (1998)** Influence of water activity on *Penicillium citrinum* growth and kinetics

- of citrinin accumulation in wheat, *International Journal of Food Microbiology*, **42** : 219–223.
30. **Dan, D.N. & Dac, P.T. (1993)** Vietnam climate. *Science and Technology Publication*, Hanoi, pp. 44-50, 200-205.
 31. **David, A.M. (1995)** The NBS/ISCC Color system, <http://www.anthus.com/colors/NBS.htm>.
 32. **Davis, N.D., Iyer, S.K., & Diener, U.L. (1987)** Improve method of screening for Aflatoxin with a Coconut agar medium. *Applied and environmental Microbiology*, **53**(7): 1593-1595.
 33. **Deshpande, S. S. (2002)** Handbook of Food Toxicology. *Marcel Dekker, Inc.*, New York, USA, pp. 387-456.
 34. **Doyle, M. P., Beuchat, L. R. & Montville, T. J. (1998)** Food microbiology: Fundamentals and frontiers. *ASM press*. Washington D.C.
 35. **Dyer, S. K. & Mc.Cammon S. (1994)** Detection of toxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and related species on coconut cream agar. *Journal of Applied Bacteriology*, **76**:75–78.
 36. **Ei-Banna, A.A., Pitt, J.I. & L. Leistner, (1987)** Production of mycotoxins by *Penicillium* species, *Systematic and Applied Microbiology*, **10**: 42–46.
 37. **El Adlouni, C., Tozlovanu M., Natman, 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 Food Research*, **50**: 507-512.
 38. **Filtenborg, O., Frisvad, J.C. & Thrane, U. (1996)** Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, **33**: 85-102.
 39. **Flannigan, B. (1970)** Mycoflora of dried barley grain. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **53**: 371-379.
 40. **Franco, C.M., Fente, C.A., Vazquez, B., Cepeda, A., Lallaoui, L., Prognon, P. & Mahuzier, G. (1996)** Simple and sensitive high-

- performance liquid chromatography-fluorescence method for the determination of citrinin application to the analysis of fungal cultures and cheese extracts. *Journal of Chromatography A* **723** (1): 69–75.
41. **Frisvad, J. C. & Viuf, T. B. (1986)** Comparison of direct and dilution plating for detecting *Penicillium viridicatum* in barley containing ochratoxin. Dans King, A. D., Pitt, J. I., Beuchat, L. R. & Corry, J. E. L. (eds). *Methods for the mycological examination of food. Plenum Press, New York.*
 42. **Gqaleni, N., Smith, J.E., Lacey, J., Gettinby, G. (1997)** Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. *Applied and environmental microbiology*, **63** (3) : 1048–1053.
 43. **Ghitakou, S., Koutras, K., Kanellou, E. & Markaki, P. (2006)** Study of aflatoxin B1 and ochratoxin A production by natural microflora and *Aspergillus parasiticus* in black and green olives of Greek origin. *Food Microbiol*, **23**(7):612-21.
 44. **Hetherington, A.C. & Raistrick H. (1931)** Studies in biochemistry of micro-organism XI. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum* Thom. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B—Biological Sciences*, **220**: 269–297.
 45. **Hipgrave, D. B., Nguyen T.V., Vu M.H., Hoang T.L., Do,T.D., Tran N.T., Jolley, D., Maynard, J.E. & Beverley-ann Biggs B.-A. (2003)** Hepatitis B infection in rural Vietnam and the implications for a national program of infant immunization, *American Journal Tropical Medicine Hygiene* **69**(3): 288–294.
 46. **Hussein, S. H. & Brasel, J. M. (2001)** Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, **167**: 101-134.

47. **IARC (International Agency for Research on Cancer) (1993)** Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human: Some Naturally Occurring Substances. Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. *IARC*, Lyon, pp. 397-444.
48. **IARC (1982)** Environmental carcinogens selected methods of analysis, Volume 5-Some Mycotoxins, Lyon, pp. 66-68.
49. **Iizuka, H. (1957)** Studies on the micro-organisms found in Thai rice and Burma rice. *Journal of General Applied Microbiology*, **3**: 146-161.
50. **Iizuka H. (1958)** Studies on the micro-organisms found in Thai rice and Burma rice. Part II. On the microflora of Burma rice. *Journal of General and Applied Microbiology*, **4**: 108-199.
51. **INSPQ - Institut National de santé publique Québec (2002)**, Les risques à la santé associée à la présence de moisissures en milieu intérieur, Québec.
52. **Janardhana, G.R., Raveesha, K.A. & Shetty, H.S. (1999)** Mycotoxin contamination of maize grains grown in Karnataka (India), *Food and Chemical Toxicology* **37** (8): 863–868.
53. **Jayaraman, P., Kalyanasundama I. (1990)** Natural occurrence of mycotoxigenic fungi and mycotoxin in rice bran. *Mycophatogia* **110**: 88-85.
54. **Jayaraman P., Kalyanasundama I. (1994)** Changes in storage mycoflora of parboiled rice through difference stages of processing. *Journal of food science and technology*, **31**: 219-224.
55. **Jorgensen, K. (2005)** Occurrence of ochratoxin A in commodities and processed food – a review of EU occurrence data, *Food Additives and Contaminants* **22** (Suppl. 1): 26–30.
56. **Kanizawa, M. (1984)** Synergistic effect of citrinin on hepatorenal carcinogenesis of ochratoxin A in mice. *Developments in Food Science*, **7**: 245-254.

57. **Kiffer, E. & Morelet, M. (1997)** Les deutéromycètes. *Institut National de la Recherche Agronomique*.
58. **Krogh, P. (1987)** Ochratoxin A in food. Mycotoxin in Food. *Academic Press*, San Diego, 97-121.
59. **Kurata, H. (1990)** Mycotoxins and mycotoxicoses. In: A.E. Pohland, V.R. Dowell and J.L. Richards, Editors, Microbial toxins in foods and feeds. *Plenum Press*, New York, USA, 249–259.
60. **Kuthubutheen, A.J. (1979)** Thermophilic fungi associated with freshly harvested rice seeds. *Transactions of the British Mycological Society*, **73**: 357-359.
61. **Lepom, P. (1986)** Simultaneous determination of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A in wheat and barley by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography*, 335-399.
62. **Lin, M.T., & Dianese, J. C. (1976)** A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus spp.* *Phytopathology* **66**: 1466–1469.
63. **Luat, N.V. (2003)** Vietnam rice plants in the 20th century. *Agriculture Publication*, Hanoi, pp. 174-176.
64. **Luster, M. I., Germolec, D. R., Burleson, G. R., Jameson, C. W., Ackermann, M. F., Lamm, K. R. & Hayes, H. T. (1987)** Selective immunosuppression in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A. *Cancer Res*, **47**: 2259-2263.
65. **Majumder, S.K. (1974)** Control of microflora and related production of mycotoxins in store sorghum, rice and groundnut. *Mysor- India Pathopathology*, **42**: 469.
66. **Mallick, A.K. & Nandi, B. (1981)** Research: rice results of India experiments. *Rice Journal*, **84**: 8-13, 19-23.
67. **Manderville, R.A. & Pfohl-Leszkowicz, A. (2006)** Genotoxicity of chlorophenols and ochratoxin A. *Advance in molecular toxicology*, **1**: 73-118.

68. **Massey, T.E., Stewart, R.K., Daniels, J.M. & Ling, L. (1995)** Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B1 carcinogenicity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **208**: 213-217.
69. **Meister, U. (2004)** New method of citrinin determination by HPLC after polyamide column clean-up. *European Food Research and Technology* **218**: 394–399.
70. **Meyer, A., Deiana, J. & Bernard, A. (2004)** Cour de microbiologie générale. Doin. France.
71. **Mills, J.T., Seifert, K.A., Frisvad, J.C., & Abramson, D. (1995)** Nephrotoxicogenic *Penicillium* species occurring on farm – stored cereal grains in western Canada. *Mycopathologia*, **130**: 23-28.
72. **Mheen, T.-I., Cheigh, H.-S., Ragunathan, A.N. & Majumder, K.S. (1982)** Studies on the fungi in stored rice. *Korean Journal of Applied Microbiology and Bioengineering* **10**: 191–196.
73. **Molinié A., Faucet V., Castegnaro M. & Pfohl-Leszkowicz A. (2005)** Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B1: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. *Food Chemistry*, **92**, 391-400.
74. **Molinié, A. (2004)**, Qualité sanitaire des blés en région Midi-Pyrénées : suivi du taux de contamination en mycotoxines de stockage (Ochratoxine A et citrinine). Etude des effets biologiques de l'exposition à ces deux toxines. These, *ENSAT-INP* Toulouse.
75. **Moss, M.O. (2002)** Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs, *International Biodeterioration & Biodegradation*, **50**: 137 – 142
76. **Moubasher A.H., El-Naghy M.A. & Abdel-Hafez S.I. (1972)** Studies on the fungus flora of three grains in Egypt. *Mycopathologia*, **47**: 261-274.

77. **Multon, J.L. (1997)**, L'état thermodynamique de l'eau dans les milieux biologiques et alimentaires", p4-14 dans un livre 'moisissures des aliments peu hydratés' Cahagnier B. (Coordinateur) *Tec et Doc*, 1997.
78. **Müller, H.M. (1982)** Decontamination of mycotoxins. I. Physical process. *Ubersicht Tierernähr*, **10** : 95-122.
79. **Nakasone, K.K., Peterson S.W., & Jong S-C. (2004)** Preservation and distribution of fungal cultures. Dans "Biodiversity of fungi - Inventory and Monitoring Methods" de Gregory M. Mueller *et al.*, *Elsevier Press*, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, pp. 37-47.
80. **NTP- National Toxicology Program (1989)** Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A (CAS No 303-47-9) in F344/N rats (Gavage Studies). Technical Report 358: DHHS Publication (NIH 89-2813). *NTP, Research Triangle Park, USA*.
81. **Northolt, M.D., Verhulsdonk, C.A.H., Soentoro, P.S.S., Paulsch, W.E. (1976)** Effect of water activity and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Milk and Food Technology* **39**: 170–174.
82. **Orti, D.L., Hill, R.H., Liddle, J.A., Needham, L.L. & L. Vickers (1986)** High performance liquid chromatography of mycotoxin metabolites in human urine, *Journal of Analytical Toxicology*, **10** (2) : 41–45.
83. **Ominski, K. H., Marquardt, R. R., Sinha, R. N., & Abramson D. (1994)** Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. In J. D. Miller, & H. L. Trenholm (Eds.), *Mycotoxins in grain*. St Paul, MN: *Eagan Press*, pp. 287–312.
84. **Olsen, M., Jonsson, N., Magan, N., Banks, J., Fanelli, C., Rizzo, A., Haikar, A., Dobson, A., Frisvad, J., Holmes, S., Olkku, J., Persson, S. J. & Börjesson, T. (2003)** Prevention of Ochratoxin A in Cereals.

- OTA PREV. Final Report. Quality of Life and Management of Living Resources. Project No. QLK1-CT-1999-00433.
85. **Park, J. W., Kim, E.K., Kim, Y.B. (2004)** Estimation of the daily exposure of Koreans to aflatoxin B₁ through food consumption. *Food Additives and Contaminants*. **21(1)**: 70-75.
 86. **Park, J. W., Sang-Youn Choi, Han-Joon Hwang, Young-Bae Kim (2005)** Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. *International Journal of Food Microbiology*, **103**: 305– 314.
 87. **Pelhat J. (1968)** Inventaire de la mycoflore des blés de conservation. *Bulletin trimestriel de la Société mycologique de France*, **84**:127-143.
 88. **Perry, J. J., Staley J. T. & Lory, S. (2004)** Microbiologie. *Dunod*, France.
 89. **Pfohl-Leszkowicz, A. (1999)** Métabolisation des mycotoxines- Effets biologiques et pathologies- Ecotoxicogénèse. Dans « Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque » de Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. *Technique et Documentation*, Paris, pp. 18- 35.
 90. **Pfohl-Leszkowicz A., Petkova-Bocharova T., Chernozemsky I.N. & Castegnaro M. (2002)** Balkan endemic nephropathy and the associated urinary tract tumours: review on etiological causes, potential role of mycotoxins. *Food Additive and Contaminants* **19** (3): 282-302.
 91. **Pfohl-Leszkowicz, A., Molinié, A., & Castegnaro, M. (2004)** Presence of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B₁ in breakfast cereals collected in french market. Comparison of OTA analysis using or not immunoaffinity clean-up before HPLC. *The revista Mexicana de Micologia*. **19** : 7-15.
 92. **Pfohl-Leszkowicz, A. & Castegnaro, M. (2005)** Further arguments in favour of direct covalent binding of Ochratoxin A (OTA) after metabolic

- biotransformation. *Food Additives & Contaminants*, Volume 22, Supplement 1/2005.
93. **Pfohl-Leszkowicz, A. & Manderville R.A (2007)** Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, **51 (1)**:61-99.
 94. **Phillips, R.D., Hayes, A.W. & Berndt, W.O. (1980)** High-performance liquid chromatographic analysis of the mycotoxin citrinin and its application to biological fluids. *Journal of Chromatography* **190(2)**: 419–427.
 95. **Pitt, J.I., Hocking, A.D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B.F., Wheeler, K.A. & Tanboon, E.K.P. (1994)** The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2: Beans, rice, small grains and other commodities. *International Journal of Food Microbiology* **23**: 35– 53.
 96. **Pitt, J.I., Hoking, A.D. (1997)** Fungi and Food Spoilage. *Blackie Academic & Profesional*, London- Weinheim- NewYork- Tokyo- Melbourne- Madras.
 97. **Pohland, A. E., Nesheim, S., Friedman, L. (1992)** Ochratoxin A: a review. *Pure and Applied Chemistry*, **64**: 1029-1046.
 98. **Poupko, R., Luz, Z. & Destro, R. (1997)** Carbon-13 NMR of citrinin in the solid state and in solutions, *Journal of Physical Chemistry A*, **101 (28)** : 5097 -5102.
 99. **Rabie C. J., Lübben A., Marais G. J. et H. Jansen Van Vuuren (1997)** Enumeration of fungi in barley. *International Journal of Food Microbiology*, **35 (1-2)**: 117-127.
 100. **R-Biopharm France.** Kobra Cell.
 101. **Reddy, S.V. and Farid Waliyar.** Properties of Aflatoxin and it producing fungi. <http://www.aflatoxin.info/aflatoxin.asp>.
 102. **Règlement (CE) N° 1881/2006** de la Commission du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires

103. **Reinhard, H. & Zimmerli, B. (1999)** Reversed-phase liquid chromatographic behavior of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A. *Journal of Chromatography A*, **862** (2) : 147–159.
104. **Rockland, L.B. (1960)** Saturated salt solutions for static control of relative humidity between 5° and 40°C. *Analytical Chemistry*, **32**: 1375-1376.
105. **Rouessac, F. & Rouessac, A. (1994)** Analyse chimique- Méthodes et Techniques Instrumentales Modernes. *Masson*, Paris, Milan, Barcelone, 39-53.
106. **Samarajeewa, U., Thambaramala, V. & Gamage (1988)** Combination of solvent and radiation effects on degradation of aflatoxin B₁. *World journal of microbiology and biotechnology*, **4** (2).
107. **Sauer D.B., Storey C.L., Walker D.E. (1984)** Fungal populations in U.S. farm-stored grain and their relationship to moisture, storage time, regions and insect infestation. *Phytopathology*, **74** : 1050-1053.
108. **Scientific committee on Food opinion on Ochratoxin A.** CS/CNTM/MTC/14 Final annex II to document XXI/2210/98, Brussels : CEC, 1998
109. **Schmidt, F.R. & Esser, K., (1985)** Aflatoxin: Medical, Economic Impact, and Prospects for Control. *Process Biochemistry*, **20**: 167-173.
110. **Schneweis, I., Meyer, K., Hörmansdorfer, S. & Bauer, J. (2001)** Metabolites of *Monascus ruber* in silages. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **85** (1–2) : 38–44.
111. **Scott, WJ. (1957)** Water relations of food spoilage microorganisms. *Advances in Food Research*, **7**:83–127.
112. **Scudamore, K.A. & Hetmanski, M. (1992)** Analysis of mycotoxins in cereals and animal feeds using a multi-toxin gel permeation chromatography clean-up method. *Mycotoxin Research* **8** : 37–47.
113. **Scudamore K.A., Hetmanski, M.T., Chan, H.K. & Collins, S. (1997)** Occurrence of mycotoxins in raw ingredients used for animal feeding

- stuffs in the United Kingdom in 1992. *Food Additives and Contaminants* **14**: 157–173.
114. **Sevastianos, R., Zaouia, N., Salih, G., Tantaoui Elaraki, A., Lamrani, K., Cheheb, M., Hassouni, H., Frederic, V., Isabelle, G. P., Christopher, A. Ismaili, A. M. (2006)** Characterization of filamentous fungi isolated from Moroccan olive and olive cake: Toxinogenic potential of *Aspergillus* strains. *Molecular Nutrition and Food Research*, **50** (6): 500-506.
 115. **Shotwell, O.L., Hesseltine, C.W., Stubblefield, R.D. & Sorenson, W.G. (1966)** Production of aflatoxin on rice. *Applied Microbiology*, **14**: 425-428.
 116. **Shu, P.Y. & Lin, C.H. (2002)** Simple and sensitive determination of citrinin in monascus by GC-selected ion monitoring mass spectrometry. *Analytical Sciences*, **18** (3) : 283–287.
 117. **Simas, M.M.S., Botura, M.B., Correa, B., Sabino, M., Mallmann, C.A., Bitencourt, T.C.B.S.C. & Batatinha, M.J.M. (2007)** Determination of fungal microbiota and mycotoxins in brewers grain used in dairy cattle feeding in the State of Bahia, Brazil. *Food Control*, **18** (5) : 404-408.
 118. **Smith, J. E., Lewis, C. W., Anderson, J. G. & Solomons, G. L. (1994)** Mycotoxins in human nutrition and health. *Research and Development European Commission*.
 119. **Son, C.H.N., Anh, P.T., Hao, L.B., Huong, H.T.T., Duy, K.H.D., Anh, L.Q. & Blanc, M. (1998)** Enquête sur la contamination par les aflatoxines des produits agricoles et agro-alimentaires au Sud Vietnam. *Revue de Medecine Veterinaire*, **149**: 705.
 120. **Stoloff, L., dans Egan H. (Editor) (1982)** Environmental carcinogens. Selected methods of analysis. Vol. 5. Some mycotoxins. No.44, *IARC*, Lyon, 33-62.

121. **Strohl, W. R. (1997)** Industrial antibiotics: today and the future. In WR (ed) Bio/technology of antibiotics. *Marcel Dekker*, New York. 1-47.
122. **Sweeney, M.J., Dobson, A.D.W. (1998)** Review: Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* Species. *International Journal of Food Microbiology* 43 : 141–158.
123. **Tonon, S.A., Marucci, R.S., Jerke, G. & Garcia, A. (1997)** Mycoflora of paddy and milled rice produced in the region of north-eastern Argentina and southern Paraguay. *International Journal of Food Microbiology*, **37**: 231– 235.
124. **Tozlovanu, M., Faucet-Marquis, V., Pfohl-Leszkowicz, A. & Manderville, R. A. (2006)** Genotoxicity of the Hydroquinone Metabolite of Ochratoxin A: Structure-Activity Relationships for Covalent DNA Adduction. *Chemical Research in Toxicology*, **19** (9): 1241 -1247.
125. **Trucksess, M.W., Pohland, A.E. (2001)** Mycotoxin Protocols. *Humana Press*, NewJersey, USA.
126. **Trung, T.S., J.D. Bailly, A. Querin, P. Le Bars & P. Guerre (2001)** Fungal contamination of rice from south Vietnam, mycotoxinogenesis of selected strains and residues in rice. *Revue de Medecine Veterinaire*, **152** (7): 555-560.
127. **Urbano, G.R., Taniwaki, M.H., De, F., Leitao, M.F. & Vicentini, M.C. (2001)** Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. *Journal of Food Protection*, **64** (8) : 1226-1230.
128. **Vail, R.B. & Homann, M.J. (1990)** Rapid and sensitive detection of citrinin production during fungal fermentation using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, **535** (1–2) : 317– 323.
129. **Vazquez, B.I., Fente, C., Franco, C., Cepeda, A., Prognon, P. & Mahuzier, G. (1996)** Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A and citrinin in cheese by

- time-resolved luminescence using terbium. *Journal of Chromatography A*, **727**: 185–193.
130. **Vrabcheva, T., Usleber, E., Dietrich, R. & Martlbauer, E., (2000)** Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgaria villages with a history of Balkan endemic nephropathy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 2483-2488.
 131. **Wild, C.P., Hudson, G.J., Sabbioni, G., Chapot, B., Hall, A.J., Wogan, G.N., Whittle, H., Montesano, R. & Groopman, J.D. (1992)** Dietary intake of aflatoxins and the level of aflatoxin in peripheral blood in the Gambia, West Africa, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **1**, 229-234.
 132. **Wu, W.S. & Dow, S.K. (1993)** A survey of rice seed-borne fungi in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin*. **2**: 52-55.
 133. **Xu, B.J., Wang, Q.J., Lee, J.H., Jia, X.Q. & Sung, C.K. (2003)** HPLC analysis of citrinin in red yeast rice. *Food Science and Biotechnology* **12** (4): 376–380.
 134. **Zimmerli, B., Dick, R. & Baumann, U. (1989)** High-performance liquid chromatographic determination of citrinin in cereals using an acid-buffered silica gel column. *Journal of Chromatography* **462** : 406–410.

Annexe : Composition des milieux de culture

***Aspergillus flavus* et *parasiticus* agar (AFPA)**

Peptone, bactériologique	10 g
Extrait de levure	20 g
Citrate d'ammonium ferrique	0,5 g
Chloramphénicol	100 mg
Agar	15 g
Dichloran	2mg
	(0,2% dans éthanol, 1 ml)
L'eau, distillée (qsp.)	1 litre

Après l'addition de tous les ingrédients, stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Le pH final de ce milieu est 6,0-6,5.

Czapek yeast extract agar (CYA)

K ₂ HPO ₄	1 g
Czapek concentré	10 ml
Solution de métaux	1 ml
Extrait de levure, en poudre	5 g
Sucre	30 g
Agar	15g
Eau, distillée (qsp.)	1 litre

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

Czapek concentré

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

Czapek concentré se maintiendra indéfiniment sans stérilisation. Le précipité de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ qui se forme avec le temps peut être re-suspendu en agitant avant emploi.

Solution de métaux

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
Eau, distillée	100 ml

Maintenir indéfiniment sans stérilisation.

Coconut agar

Cent grammes de la noix de coco déchiquetée ont été homogénéisés pendant 5 minutes avec 300 ml d'eau distillée chaude. La solution est filtrée à l'aide du tissu. L'agar a été ajouté (20 g/liter). Le mélange a été alors stérilisé à l'autoclave à $121^\circ\text{C}/15$ minutes. Le pH final est de 7,0.

Dichloran 18% glycérol agar (DG18)

Glucose	10 g
Peptone	5 g
KH_2PO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
Glycérol, A.R.	220 g
Agar	15 g
Dichloran	2 mg
(0,2% p/v dans éthanol, 1 ml)	
Chloramphénicol	100 mg
Eau, distillée	1 litre

Tous les ingrédients sont mélangés sauf le glycérol avec 800 ml d'eau distillée. Faire fondre l'agar, et ajouter de l'eau distillée. Ajouter le glycérol (concentration finale 18% p/p). Stériliser à l'autoclave 121°C pendant 15 minutes. L' a_w final de ce milieu est 0,955 et le pH est de 5,5 à 5,8.

25% Glycérol nitrate agar (G25N)

K ₂ HPO ₄	0,75 g
Czapek concentré	7,5 ml
Extrait de levure	3,7 g
Glycérol, grade analytique	250 g
Agar	12 g
Eau, distillée	750 ml

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Le pH final est de 7,0.

Malt extract agar (MEA)

Extrait de malt	20 g
Peptone	1 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Eau, distillée (qsp.)	1 litre

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 min. Ne pas stériliser plus longtemps, car ce milieu deviendra doux sur le chauffage prolongé ou répété. Le pH final est de 5,6.

Yeast Extract Sucrose Agar (YES)

Extrait de levure, en poudre	20 g
Sucre	150 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
Agar	20g
Eau, distillée (qsp.)	1 litre

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 min.



Occurrence of aflatoxin B₁, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam

Minh Tri Nguyen^{a,b}, Mariana Tozlovanu^b, Thi Luyen Tran^a, Annie Pfohl-Leszkowicz^{b,*}

^a Nha Trang University, 02 Nguyen Dinh Chieu, Nha Trang, Viet Nam

^b UMR CNRS/INPT 5503, Department BioSym, ENSAT, 1 Avenue Agrobiopole, 31326 Auzeville-Tolosane, France

Received 9 October 2006; received in revised form 22 January 2007; accepted 16 March 2007

Abstract

The possible coexistence of three mycotoxins in rice, including aflatoxin B₁ (AFB₁), citrinin (CIT) and ochratoxin A (OTA), was investigated. The samples of rice were collected in large markets in five provinces of the central region of Vietnam. These toxins were extracted, purified and finally quantified by HPLC with fluorimetry detection. Contamination of AFB₁ was found to be the most, followed by OTA, while contamination of CIT was insignificant. The coexistence of CIT with AFB₁/OTA in rice was found in high percentage. Some samples overpassed the authorized limit by Europe in OTA and/or AFB₁.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Aflatoxin B₁; Ochratoxin A; Citrinin; Mycotoxin analysis; Rice

1. Introduction

One of the most serious problems to confront the quality of rice is the presence of mycotoxins which are produced by different species of the genus *Aspergillus* or *Penicillium*. Aflatoxins are of greatest concern as they are highly toxic, mutagenic, teratogenic and carcinogenic compounds that have been implicated as causative agents in human hepatic and extrahepatic carcinogenesis (Castegnaro & Pfohl-Leszkowicz, 1999; Hussein & Brasel, 2001; IARC, 1993; INSPQ, 2002; Massey, Stewart, Daniels, & Ling, 1995).

Ochratoxin A and citrinin are produced by some *Aspergillus* (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*) or *Penicillia* (*Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and *Penicillium cyclopium*). It has been reported that ochratoxin A is a teratogenic, potent renal carcinogen (for review see IARC, 1993; Manderville & Pfohl-Leszkowicz, 2006; Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 1999). Some studies have found the implication of

ochratoxin A in certain epidemic nephropathies in animals and humans (Bennett & Klich, 2003; Castegnaro et al., 2006; Pfohl-Leszkowicz, Petkova-Bocharova, Chernozemsky, & Castegnaro, 2002).

Similarly, some scientific reports show a link between citrinin and nephrotoxic (kidney damaging) effects and possibly a carcinogenic effect for humans (Arai & Hibino, 1983; NTP, 1989). Citrinin enhances carcinogenicity induced by OTA (Kanizawa, 1984).

The central region of Vietnam is narrow and long (Fig. 1). So there are various types of climate there. In the region Quang Nam–Quang Ngai, with high level of rain and humidity, the average relative humidity is high, up to 90% and higher than the region Binh Dinh–Phu Yen–Nha Trang (average 80%) (Dan & Dac, 1993). In Vietnam, the conditions of storage of rice vary but local commercial rice may be badly stored, and sold without packing; it is directly exposed to moist warm air. Mould and mycotoxin contamination is highly risky. It can seriously affect consumer health.

Some studies have shown that the contamination of rice samples, collected in the south of Vietnam, by aflatoxin B₁

* Corresponding author. Tel./fax: +33 562193947.

E-mail address: leszkowicz@ensat.fr (A. Pfohl-Leszkowicz).



Fig. 1. Map of Vietnam. Rice has been collected in five areas X1 – Quang Nam; X2 – Quang Ngai; X3 – Binh Dinh; X4 – Phu Yen; X5 – Nha Trang.

and OTA were high, reaching levels up to 27 ng/g and 26 ng/g, respectively. (Son et al., 1998; Trung, Bailly, Querin, Le Bars, & Guerre, 2001).

The objective of our study is to investigate the presence of three mycotoxins (OTA, CIT and AFB1) in rice samples collected from five provinces (Quang Nam, Quang Ngai, Binh Dinh, Phu Yen and Nha Trang) of central regions in Vietnam (Fig. 1). To quantify the amounts of these toxins in rice, a simultaneous analytical method was developed, using an HPLC system with fluorimetry detection.

2. Materials and methods

2.1. Samples

One hundred samples of rice were randomly collected from five provinces (Quang Nam, Quang Ngai, Binh Dinh, Phu Yen, and Nha Trang) of the central region of Vietnam. They were collected in November (rainy season) and in April (dry season). A minimum sample size of 500 g was applied and samples were kept at -20°C in PE bags while awaiting analysis.

2.2. Reagents

All reagents (potassium chloride, phosphoric acid, hydrochloric acid) were of PA grade. All solvents (methanol, acetonitrile, propanol-2-ol, *n*-hexane, chloroform) were of HPLC grade. Deionised water was used for the preparation of all aqueous solutions and for HPLC. Standard toxins, AFB1, CIT, OTA, were supplied by Sigma Chemicals.

2.3. Preparation of standard solutions

Standard solutions AFB1, CIT and OTA were prepared by dissolving 10 mg of AFB1, CIT or OTA in 1 ml of methanol. The concentration of the AFB1 stock solution was determined by measuring the UV absorbance at 360 nm and calculating by using the molar extinction coefficient ϵ of $21\,800\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (IARC, 1982). The concentration of the CIT stock solution was determined by measuring the UV absorbance at 321 nm and calculating by using the molar extinction coefficient ϵ of $5490\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Molinié, Faucet, Castegnaro, & Pfohl-Leskowicz, 2005). The concentration of the OTA stock solution was determined by measuring the UV absorbance at 333 nm and calculating by using the molar extinction coefficient ϵ of $5440\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (IARC, 1993).

A series of working standards ranging from 3.13 to 100 ng of each mycotoxin per ml of methanol was prepared by dilution (equivalent to a concentration of mycotoxin in rice from 0.078 to 2.5 ng/g). They were used to calibrate the LC detector responses.

2.4. Confirmation of the presence of OTA

The confirmation of the presence of OTA in some rice samples was achieved by the following technique: an aliquot, taken from the purified extract of a sample where OTA was detected by the HPLC analysis, was dried. The pellet was dissolved in 975 μl of a buffer solution of 0.04 M Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7.5. Then, 25 μl of carboxypeptidase (100 U/ml H_2O) was added and the mixture was incubated at room temperature overnight. The sample was analysed under the same HPLC chromatographic conditions as used above. The OTA peak disappeared whereas the peak of α -OT appeared.

2.5. Confirmation of the presence of AFB₁

Underivatised AFB₁ was separated by HPLC and detected by spectrofluorimetry after post-column derivatisation in the Kobra cell[®] where it was converted into the 9,10-dibromo derivative.

2.6. Procedure

2.6.1. Extraction of toxins

Ground uncoated rice (20 g) were extracted with 100 ml of acetonitrile–4% aqueous solution of potassium chloride (9:1). This mixture was adjusted to pH 1.5 with undiluted hydrochloric acid, and then shaken on an orbital shaker for 20 min and filtered through a Whatman No. 4 paper under vacuum.

2.6.2. Purification

One hundred ml of *n*-hexane were added to the filtrate and shaken 10 min. After separating, the upper phase (*n*-hexane) was discarded. This step was repeated with 50 ml of *n*-hexane. To the lower phase, 50 ml deionised water and 50 ml chloroform were added. The solution was shaken for 10 min. After separation, the lower phase (chloroform) was collected. The upper phase was re-extracted, twice, with 25 ml of chloroform, using the above conditions. The chloroform extracts were pooled. Then the chloroform was evaporated to near dryness under vacuum by using a rotary evaporator in a 40 °C water bath at low speed. Two milliliter of methanol were added and the solution was sonicated and filtered through a 0.45 µm filter and finally evaporated to dryness under nitrogen. For analysis in the HPLC system, 500 µl of methanol were added.

2.6.3. HPLC conditions

A Shimadzu (Kyoto, Japan) LC-10, equipped with an injector 20 µl loop, a C18 spherisorb column (3 µm C18, 0.46 × 25 cm) and a fluorescence detector (Spectra physic 2000), was used. Different excitation and emission fluorescence parameters (AFB₁ 365 and 440 nm; OTA 335 and 465 nm; CIT 331 and 500 nm) were used to achieve the optimal conditions of detection for each toxin. The system was run isocratically, with mobile phase (0.33 M) H₃PO₄/acetonitrile/propan-2-ol (650/400/50); flow rate was 0.5 ml/min; elution times of AFB₁, CIT and OTA were about 14, 28 and 56 min, respectively.

The chromatograms were analyzed by a Class-LC10 software version 1.6 Shimadzu (Fig. 2).

3. Results and discussion

3.1. Simultaneous analytical method for AFB₁, CIT and OTA in rice

3.1.1. Recoveries

Five different uncontaminated rice samples were spiked with each toxin at 5 ng/g. The average recoveries and the

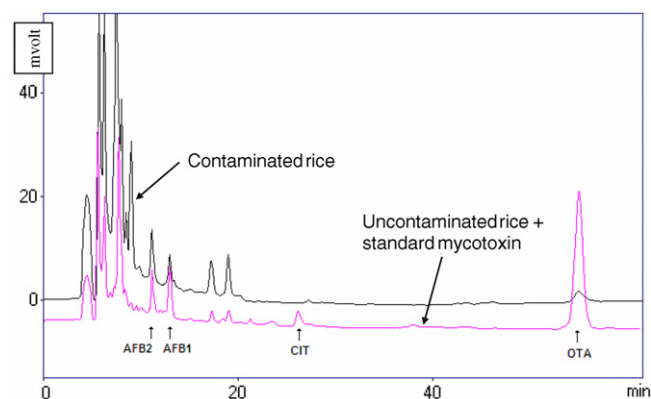


Fig. 2. Example of separation of mycotoxins extracted from rice.

relative standard derivations (RSD) for AFB₁, CIT and OTA are presented in Table 1.

The results demonstrate the high reproducibility of the method. They are satisfactory in regard to the EU legislation (Nos. 472/2002 and 26/2002). It appears that, between 1 and 10 ng/g, the recoveries are acceptable in the range 70–110% and the RSD should be <20%.

3.1.2. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ)

LOD and LOQ were determined by taking 3.3 and 10 times the standard deviation, (respectively), using the slope of calibration of each toxin. Results are presented in Table 2.

3.2. Sample analysis

As can be seen from Tables 3 and 4, AFB₁ was found in just over one half of the total number of samples (51%). It should be noted, however, that AFB₁ was present in all five provinces of the central region of Vietnam. CIT, on the other hand, was only quantified in two samples out of 13 contaminated samples. OTA was not quantified in rice in the province of Quang Nam; however, other provinces had rice contaminated in approximately one third of the total number of samples.

It is clear from Table 4 and Figs. 3 and 4 that the season had an impact on the contamination by these mycotoxins. In the rainy season, the ratio of detectable samples and average of quantifiable samples of AFB₁ in rice were higher than in the dry season ($p < 0.05$).

Except for the province of Binh Dinh, the occurrence of AFB₁ in other provinces in the rainy season was much higher than those in the dry season. For example, the high-

Table 1

The average recoveries and the relative standard deviations of each mycotoxin

Mycotoxin	Average recoveries (%)	RSD (%)
AFB ₁	90.1	6
OTA	84.1	6.7
CIT	103	5.4

Table 2
LOD and LOQ of AFB1, CIT and OTA

	AFB1	CIT	OTA
LOD (ng/g)	0.07	0.11	0.08
LOQ (ng/g)	0.22	0.35	0.25

Table 3
Analytical results of 100 samples from 5 provinces of central region of Vietnam

Mycotoxin	Detectable samples Number	Quantifiable samples		
		Number	Average (ng/g)	Maximum (ng/g)
AFB1	51	35	3.31	29.8
CIT	13	2	0.38	0.42
OTA	35	20	0.75	2.78

est amount of AFB1 found in rice in the province of Quang Nam was seven-folds higher in the rainy season than in the dry season.

Conforming with the WHO regulations for AFB1 (30 ng/g), there are no samples that exceed this limit. How-

Table 4
Analytical results of samples from each of five provinces of central region in Vietnam

Province	Season sampling	Number of samples analysed	Type of mycotoxin	Detectable samples > LOD	Quantifiable samples > LOQ		
				Number	Number	Average (ng/g) ^a	Highest value (ng/g)
Quang Nam	Rainy season	10	AFB1	7/10	7/7	10.08	29.82
			CIT	1/10	0	–	–
			OTA	4/10	0	–	–
	Dry season	10	AFB1	5/10	5/5	1.77	4.44
			CIT	0/10	0	–	–
			OTA	4/10	0/4	–	–
Quang Ngai	Rainy season	10	AFB1	8/10	5/8	4.5	12.43
			CIT	0/10	0	–	–
			OTA	0/10	0	–	–
	Dry season	10	AFB1	4/10	2/4	0.55	0.65
			CIT	1/10	0	–	–
			OTA	8/10	7/8	0.58	0.87
Binh Dinh	Rainy season	10	AFB1	7/10	5/7	0.58	0.75
			CIT	4/10	1/4	0.42	0.42
			OTA	2/10	1/2	0.35	0.35
	Dry season	10	AFB1	1/10	1/1	1.34	1.34
			CIT	0	0	–	–
			OTA	4/10	2/4	1.03	1.63
Phu Yen	Rainy season	10	AFB1	7/10	5/7	0.95	2.33
			CIT	4/10	3/4	0.34	0.38
			OTA	2/10	1/2	0.29	0.29
	Dry season	10	AFB1	1/10	1/1	0.89	0.89
			CIT	0/10	0	–	–
			OTA	4/10	4/4	0.85	1.87
Nha Trang	Rainy season	10	AFB1	8/10	5/8	2.21	7.2
			CIT	0/10	0	–	–
			OTA	0/10	0	–	–
	Dry season	10	AFB1	2/10	2/2	0.96	1.41
			CIT	0	0	–	–
			OTA	5/10	4/5	0.99	2.78

^a Average take into account only the samples above LOQ.

ever, the European Community agreed, on 16 July 1998, a limit of 2 ng/g of AFB1 in a range of foods for human consumption. There were 10 samples that exceeded this limit (Adams & Moss, 2002).

The major staple food in many Asian countries, including Vietnam, is rice. The daily intake of rice by the average adult Vietnamese is estimated to be 500 g. For the highest AFB1-contaminated sample (29.8 ng/g), the level of AFB1 contamination was up to 15 µg/person/day and daily intake of AFB1 for a 60 kg person would be 296 ng/kg b.w./day. According to Wild et al. (1992), this is a risky factor for cancer.

The maximum amounts of CIT detected in rice in the provinces of Binh Dinh and Phu Yen in the rainy season were 0.42 ng/g and 0.38 ng/g, respectively, whereas, no CIT was found in rice in the dry season.

In the dry season, OTA can be found in rice in the provinces of Binh Dinh and Phu Yen up to 1.63 ng/g and 1.87 ng/g, respectively, compared to 0.35 and 0.29 ng/g in the rainy season.

In the same way, the maximum amounts of OTA found in the provinces of Quang Ngai and Nha Trang in the dry

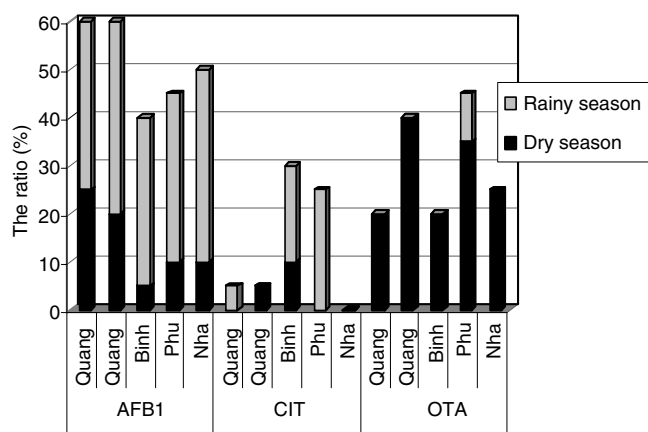


Fig. 3. The proportion (ratio) of AFB1-, CIT- and OTA-contaminated samples in rice from five provinces.

season were 0.87 ng/g and 2.78 ng/g, respectively and, in Quang Nam, OTA was not quantified, whereas, no OTA was detected in rice in the rainy season of these provinces.

The European Community has put limits of 5 ng/g in raw cereal and 3 ng/g in processed food. According to the joint expert committee on food and additives (JECFA), the provisional tolerable weekly intake (TWI) of OTA (based on nephrotoxicity in pig) is 100 ng/kg b.w./week, equivalent to 6 µg/week for a person weighing 60 kg. If we take into account the EU legislation based on carcinogenicity of OTA, the daily intake (TDI) is much lower and corresponds to 5 ng/kg b.w./day. This means a consumption of 300 ng/day for a person weighing 60 kg. Consumption of the most contaminated rice corresponds to 1390 ng/day. This is five times higher than the EU recommendation and 1.6 times higher than JECFA recommendation. Our result suggests that human exposure to OTA via contaminated rice contributes significantly to public health risk.

As can be seen from Table 5, among AFB1 and OTA co-contaminated rice samples, 69.23% and 61.54% are contaminated by CIT, respectively.

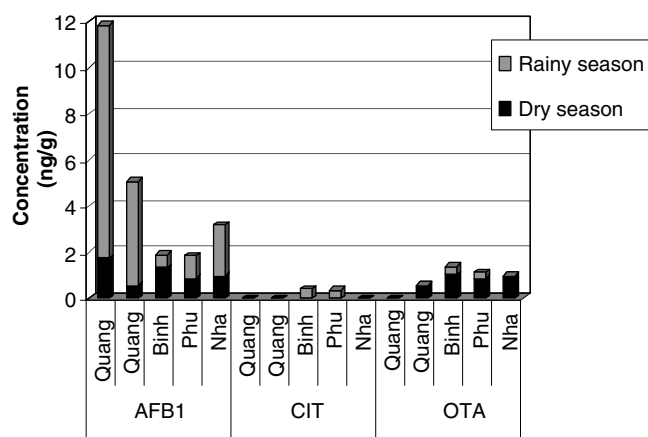


Fig. 4. The quantifiable averages of AFB1-, CIT- and OTA- contaminated samples in rice from five provinces.

Table 5

The simultaneous contamination percentage of each mycotoxin (A) to total number of other mycotoxin (B) contaminated samples

B	A		
	AFB1	CIT	OTA
AFB1	–	17.65%	21.57%
CIT	69.23%	–	61.54%
OTA	31.43%	22.86%	–

This is particularly important in regard to possible synergism and additive effects of these mycotoxins. Such co-contamination has been previously observed with other food samples, such as wheat (Vrabcheva, Usleber, Dietrich, & Martlbauer, 2000) breakfast cereal (Molinié et al., 2005; Pfohl-Leszkowicz, Molinié, & Castegnaro, 2004) or olives (El Adlouni, Tozlovanu, Natman, Faïd, & Pfohl-Leszkowicz, 2006; Heperkan, Meric, Sismanoglu, Dalkılıç, & Güler, 2006).

4. Conclusion

The contamination of these mycotoxins in rice in five provinces of the central region of Vietnam was alarmingly high, especially AFB1, predominantly, but also OTA for some samples.

The level of contamination by these toxins in rice was greatly affected by the season of the year, particularly the rainy season which proved to be the major risk factor for the presence of AFB1 and CIT. So it is necessary to have an appropriate method for rice preservation during the distribution to consumers, particularly in the markets.

The coexistence of CIT with AFB1/OTA in rice was found in a high percentage of samples and thus should be taken into consideration as claimed by the European community (Scientific committee on Food opinion on Ochratoxin A. CS/CNTM/MTC/14 Final annex II to document XXI/2210/98, Brussels: CEC, 1998).

Acknowledgements

The authors wish to thank the French Government for providing a fellowship to Nguyen Minh Tri to come to Toulouse, France, and financial support from the “Midi-Pyrénées Region” Nos. 99008345 and 03001160.

References

- Adams, M. R., & Moss, M. O. (2002). Toxigenic Fungi in Food Microbiology. *RSC, UK*, 282–301.
- Arai, M., & Hibino, T. (1983). Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats. *Cancer Letters*, 17, 281–287.
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review*, 16, 497–516.
- Castegnaro, M., & Pfohl-Leszkowicz, A. (1999). Les Aflatoxines In: Lavoisier, Tec & doc, Mycotoxines: Evaluation et gestion du risque (pp. 199–247). Lavoisier, Paris, France.
- Castegnaro, M., Canadas, D., Vrabcheva, T., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I. N., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2006). Balkan endemic

- nephropathy: role of ochratoxin A through biomarkers. *Molecular Nutrition Food Research*, 50, 519–529.
- Dan, P. N., & Dac, P. T. (1993). *Vietnam climate*. Science and Technology Publication.
- El Adlouni, C., Tozlovanu, M., Natman, 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 Food Research*, 50, 507–512.
- Heperkan, D., Meric, B. E., Sismanoglu, G., Dalkiliç, G., & Güler, F. K. (2006). Mycobiota, mycotoxigenic fungi and citrinin production in black olives. *Advances Experimental Medicine and Biology*, 571, 203–210.
- Hussein, S., & Brasel, J. M. (2001). Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, 101–134.
- IARC, (1982), Environmental carcinogens selected methods of analysis. Volume 5–Some Mycotoxins, Lyon, pp. 66–68.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human: Some Naturally Occurring Substances. Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins (Lyon : IARC), 1993, pp. 397–444.
- INSPQ - Institut National de santé publique Québec (2002), Les risques à la santé associée à la présence de moisissures en milieu intérieur, Québec.
- Kanizawa, M. (1984). Synergistic effect of citrinin on hepatorenal carcinogenesis of ochratoxin A in mice. *Developments in Food Science*, 7, 245–254.
- Manderville, R. A., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2006). Genotoxicity of chlorophenols and ochratoxin A. *Advance in molecular toxicology*, 1, 73–118.
- Massey, T. E., Stewart, R. K., Daniels, J. M., & Ling, L. (1995). Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B1 carcinogenicity. *Proceeding Society Experimental Biology and Medicine*, 208, 213–217.
- Molinié, A., Faucet, V., Castegnaro, M., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2005). Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B1: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. *Food Chemistry*, 92, 391–400.
- NTP- National Toxicology Program (1989) Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A (CAS No 303-47-9) in F344/N rats (Gavage Studies). Technical Report 358: DHHS Publication (NIH 89-2813). NTP, Research Triangle Park, USA.
- Pfohl-Leszkowicz, A., & Castegnaro, M. (1999). Ochratoxine. In: Lavoisier, Tec & doc, Mycotoxines: Evaluation et gestion du risque (pp. 249–267). Lavoisier, Paris, France.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Molinié, A., & Castegnaro, M. (2004). Presence of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B₁ in breakfast cereals collected in French market. Comparison of OTA analysis using or not immunoaffinity clean-up before HPLC. *The Revista Mexicana de Micologia*, 19, 7–15.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I. N., & Castegnaro, M. (2002). Balkan endemic nephropathy and the associated urinary tract tumours: review on etiological causes, potential role of mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 19(3), 282–302.
- Son, C. H. N., Anh, P. T., Hao, L. B., Huong, H. T. T., Duy, K. H. D., Anh, L. Q., et al. (1998). Enquête sur la contamination par les aflatoxines des produits agricoles et agro-alimentaires au Sud Vietnam. *Revue Medecine Veterinaire*, 149, 705.
- Trung, T. S., Bailly, J. D., Querin, A., Le Bars, P., & Guerre, P. (2001). Fungal contamination of rice from south Vietnam, mycotoxinogenesis of selected strains and residues in rice. *Revue Medecine Veterinaire*, 152(7), 555–560.
- Vrabcheva, T., Usleber, E., Dietrich, R., & Martlbauer, E. (2000). Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgaria villages with a history of Balkan endemic nephropathy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2483–2488.
- Wild, C. P., Hudson, G. J., Sabbioni, G., Chapot, B., Hall, A. J., Wogan, G. N., et al. (1992). Dietary intake of aflatoxins and the level of aflatoxin in peripheral blood in the Gambia, West Africa. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 1, 229–234.

Article 2 :

A SURVEY OF MYCOFLORA AND MYCOTOXIN - PRODUCING STRAINS IN RICE FROM FIVE PROVINCES OF THE CENTRAL REGION OF VIETNAM

Abstract

A total of fifty samples of rice were obtained from markets in five provinces of the central region of Vietnam. Of these samples, 25 were collected in the rainy season, and the remaining 25 samples were collected in the dry season. Fungi contaminating the rice were enumerated by direct plating on Dichloran 18% Glycerol Agar. All fungi were isolated and identified, and the percentage of infected samples was calculated. Those belonging to the genera *Penicillium*, and *Aspergillus* were indentified to species level. The ratio of grains with fungi contamination in the rainy season (18.7%), was higher than the corresponding ratio observed in the dry season (13.5%). Storage fungi in the genera *Penicillium*, *Aspergillus* and *Eurotium* were dominant in all examined samples. In the rainy season, the ratio of samples contaminated by *A. parasiticus* was high (60%). In the fifty samples, there were 54% contaminated by *P. citrinum*, and 7% contaminated by *A. niger*, specially the co-contamination of *A. versicolor* and *A. parasiticus* was 14%. The presence of these species with their capability of mycotoxin-production, suggests that contaminated rice represents a health risk for consumers.

I. Introduction

Rice is the staple diet in a significant part of the world, particularly in Asia (Luat, 2003). The structure and chemical composition of this cereal grain makes it an ideal substrate for the establishment and growth of several fungal species. Of special concern is toxigenic fungi that produce mycotoxins including Aflatoxin (Shotwell *et al.*, 1966)

Fungal contamination of rice has been the subject of a number of previous investigations. Several studies in India, Thailand, and Taiwan showed that paddy

rice has a considerable level of fungal contamination. This contamination occurred before and during harvesting, as well as during storage (Jayaraman and Kalyanasundaram, 1990; Jayaraman and Kalyanasundaram, 1994; Pitt *et al.*, 1994; Wu and Dow, 1993)

The climatic conditions observed in Vietnam are typical for the tropical countries, and are characterized by the monsoon, with a high level of rain and a high humidity (Dan *et al.*, 1993). Under these conditions the storage of rice were interested in. Local commercially produced rice is often been inappropriately stored, and has also been sold without packing. Thus it will be directly exposed to the moist and warm air. Contamination by mould and mycotoxin formation is therefore very likely. This can considerably affect the health of the consumers.

The knowledge of the identity of each single fungal species in rice therefore facilitates the research for proper conservative conditions of rice. Surveys of mycoflora and mycotoxin - producing strains in rice from the central region of Vietnam have not been published yet.

The objective of this study was to identify the mycoflora in rice collected from the large markets of five provinces (Quang Nam, Quang Ngai, Binh Dinh, Phu Yen, Nha Trang) of the central region of Vietnam, and examine the presence of potential mycotoxigenic species found in this cereal. Aflatoxin B1 (AFB1), Citrinin (CIT) and Ochratoxin A (OTA) were concentrated.

2. Materials and Methods

2.1. Samples collection

Samples of rice were randomly obtained from five provinces (Quang Nam, Quang Ngai, Binh Dinh, Phu Yen, Nha Trang) of the Central region of Vietnam. They were collected in November (rainy season) and in April (dry season).

2.2. Mycological examination

Enumeration

The samples were examined by the Direct Plating technique described by Pitt *et al.*, (1997). One hundred rice grains per sample were surface disinfected in

0.4 % active chlorine solution for one minute at room temperature. Then, they were placed directly on Dichloran 18% Glycerol Agar (DG18). This method permits recovery of the fungi actually growing in the particles. Plates were incubated at 25°C for 5 to 7 days. These strains were conserved in distilled water at 4°C prior to further identification.

Identification

Fungal identification was carried out by using a taxonomic schemes primarily based on morphological characters. Cultures were grown for 7 days on three standard media at 25°C, and on one of these in addition at 5 and 37°C. The three media were Czapek Yeast Extract Agar (CYA) used at all three temperatures, Malt Extract Agar (MEA) and 25% Glycerol Nitrate Agar (G25N) (Pitt *et al.*, 1997).

For identification *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*, AFPA (*Aspergillus flavus* and *parasiticus* agar) was used. These strains produced conspicuous, diagnostic orange-yellow colour in the colony reverses. Czapek Yeast Extract Agar with 20% sucrose was used for identification genus *Eurotium* link: Fr. (Pitt *et al.*, 1997)

Strains Producing aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A

All fungal strains were cultured on DG18, MEA, CYA, and Coconut Agar (CA), at 25°C and 30°C for 7 days and detected by fluorescence of the medium under ultraviolet light (Davis *et al.*, 1987, Lin *et al.*, 1976, Dyer *et al.*, 1994); and YES (for OTA) (Abarca *et al.*, 1994). Each species chosen 10 strains for analyse mycotoxines. From one colony, AFB1, CIT, and OTA were extracted, purified and quantified by HPLC.

2.3. Analysis method of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A

Extraction

Mycotoxins from one colony on the agar were extracted with 30 ml of acetonitrile-4% aqueous solution of potassium chloride (9:1) at pH 1.5. The mixture was shaken on an orbital shaker for 20 min. The extract was then passed

through Whatman No. 4 paper in a porcelain filter under vacuum.

Purification

Thirty ml of n-hexane was added to the filtrate and shaken in 10 min. After separation, the upper phase (n-hexane) was discarded. This step was repeated with thirty ml of n-hexane. To the lower phase, 30 ml deionised water and 30 ml chloroform were added. The solution was shaken in 10 min. After separation, the lower phase (chloroform) was collected. The upper phase was re-extracted with 20 ml of chloroform using the conditions above. The chloroform extracts were pooled. Then the chloroform was evaporated to near dryness under vacuum by using a rotary evaporator in a 40°C water bath at low speed. Two ml of methanol were added and the solution was sonicated and filtered through 0.45 µm filter, and finally evaporated to dryness under nitrogen. For analysis in the HPLC system, a suitable volume (0.5-2 ml) of methanol was added.

Quantification on HPLC

A Shimadzu (Kyoto, Japan) LC-10 equipped with an injector 20 µl loop, a C18 Spherisorb column (3µm C18, 0.46 x 25cm) and a fluorescence detector was used. The different excitation and emission fluorescence parameters (AFB1 365 and 440 nm; OTA 335 and 465 nm; CIT 331 and 500 nm) were used depending on each toxin. The system was run isocratically, with a mobile phase of H₃PO₄ (0.33 M)/ acetonitrile/ propanol-2 (650/400/50); flow rate was 0.5 ml/min; elution time of AFB1, CIT and OTA was about 14, 28 and 56 min, respectively. The chromatograms were analysed by a Class-LC10 software version 1.6 Shimadzu.

3. Results and discussion

3.1. Mycoflora

All 50 samples have been analyzed. Among them, 25 samples from the dry season and 25 samples from the rainy season. The results are presented in the Table 1.

Table 1: Fungal infection in 50 samples of surface-disinfected rice

	Dry season samples				Rainy season samples			
	Infected grains		Infected samples		Infected grains		Infected samples	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Miscellaneous fungi	10	0,4	6	24	12	0,48	6	24
Zygomycetes	6	0,24	4	16	8	0,32	4	16
<i>Eurotium spp</i>	90	3,6	15	60	133	5,32	19	76
<i>Aspergillus spp.</i>	114	4.56	22	88	167	6,68	20	80
<i>A. penicillioides</i>	78	3,12	10	40	69	2,76	9	36
<i>A. restrictus</i>	5	0,2	1	4	10	0,4	2	8
<i>A. parasiticus</i>	14	0,56	7	28	62	2,48	15	60
<i>A. candidus</i>	3	0,12	2	8	13	0,52	4	16
<i>A. versicolor</i>	8	0,32	5	20	8	0,32	5	20
<i>A. tamarri kita</i>	4	0,16	3	12	2	0,08	2	8
<i>A. niger</i>	2	0,08	2	8	3	0,12	2	8
<i>Penicillium spp.</i>	117	4.68	19	76	147	5,88	20	80
<i>P. citrinum</i>	56	2,24	14	56	48	1,92	13	52
<i>P. restrictum</i>	4	0,16	2	8	8	0,32	2	8
<i>P. decumbens</i>	8	0,32	1	4	24	0,96	2	8
<i>P. implicatum</i>	49	1,96	11	44	67	2,68	10	40
Total	337	13.48	25	100	467	18,68	25	100

All 50 samples that were analysed showed to be contaminated by fungi. A wide variety of genera were found, mainly storage fungi (Ominski, 1994) such as *Aspergillus* (84% samples), *Penicillium* (78%) and *Eurotium* (68%). Other genera were *Zygomycetes* (16%), miscellaneous fungi (24%). Four *Eurotium*

species (*E. amstelodami*, *E. chevalieri*, *E. repens* and *E. rubrum*) were also detected. Like most *Eurotium* species, these are generally assumed to be benign fungi (Pitt *et al.*, 1997). Consequently the main concern in this study is the presence of *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp.

A. versicolor is the major producer of sterigmatocystin, this toxin is a liver carcinogen, and it appears to be only about 1/150th as potent as AFB1. But the importance is that sterigmatocystin is a precursor of the aflatoxins (Pitt *et al.*, 1997). So the co-contamination of *A. versicolor* and *A. parasiticus* (14% of fifty samples) is a risk of AFB1 contamination at high concentration.

The ratio of grains with fungi contamination in the rainy season (18.68%) was higher than the corresponding ration observed in the dry season (13.48%).

In the rainy season, *A. parasiticus* was isolated from 60% samples (2.48% of grains contaminated) followed by *Penicillium citrinum* (54%), *P. implicatum* (42%) and *A. penicillioides* (38%). Other fungi represented in a relatively high frequency were *A. versicolor* (20%) and *A. candidus* (12%). Fungi found at low frequency included *A. tamarri kita* (10%), *P. restrictum* (8%), *A. restrictus* (6%) and *P. decumbens* (6%). The co-contamination of *A. versicolor* and *A. parasiticus* was 20%.

In the dry season, *A. parasiticus* was isolated from 28% of examined samples, and only 0.56% of the grain was contaminated. While *P. citrinum* were found in a high frequency (56%), followed by *A. implicatum* (44%), *A. penicillioides* (40%, with 3.12% of grains contaminated), *A. versicolor* (20%) and *A. tamarri kita* (12%). Fungi found at low frequency included *P. restrictum* (8%), *A. restrictus* (4%) and *P. decumbens* (4%). The co-contamination of *A. versicolor* and *A. parasiticus* was 8%.

3.2. Strains Producing AFB1, CIT, OTA

AFB1 – Producing Strains

All *A. parasiticus* strains were detected the fluorescence under ultraviolet light on CA at 30°C for 7 days (Figure 2). Ten strains of *A. parasiticus* was

chosen randomly, cultured on the CA. AFB1 was detected from all of these strains (figure 1) (approximate 40 μg AFB1/g medium).

AFB1 was also detected from *P. citrinum* strains. In the all medium used for *P. citrinum*, CYA was the best. But AFB1 concentration was much lower than *A. parasiticus* strains (approximate 0.5 μg AFB1/g medium).

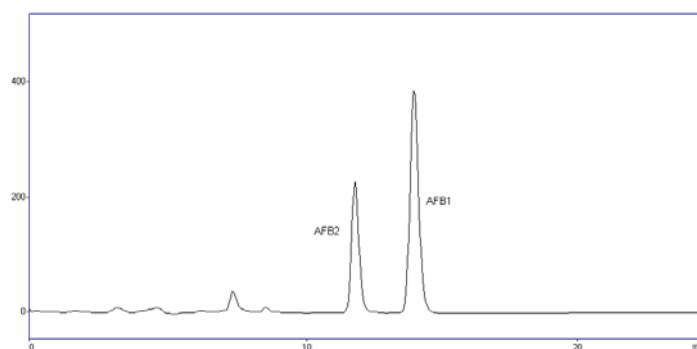


Figure 1: Chromatogram of AFB1 and B2 from CA cultured *A. parasiticus* strain.

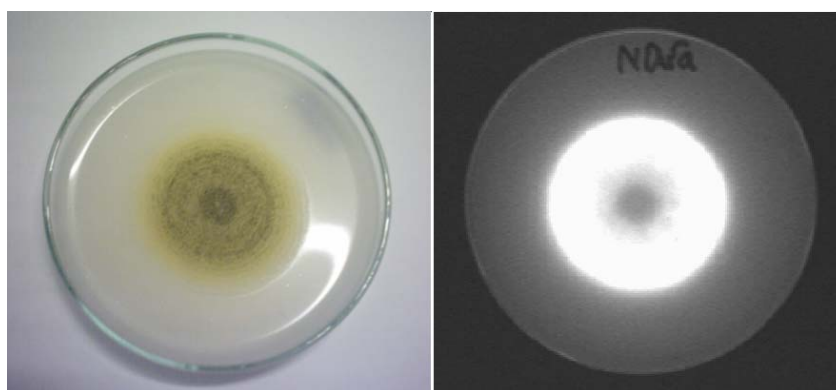


Figure 2: Colony of *A. parasiticus* on CA (left) and its fluorescence under ultraviolet light (right).

CIT – Producing Strains

P. citrinum strains were cultured on DG18, MEA, CYA, and CA and detected by fluorescence of the medium under ultraviolet light (Figure 3). As can be seen from the figure 5, on the CA, the colony's diameter of *P. citrinum* is long and the fluorescence around the colony is clearly visible. So CA was chosen to detect the fluorescence.

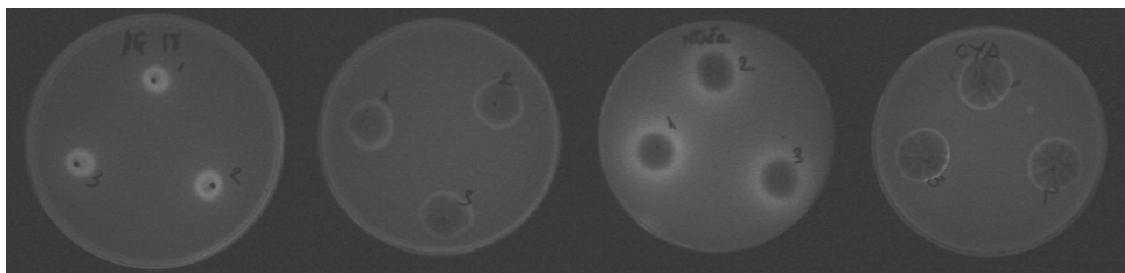


Figure 3: Fluorescence under ultraviolet light of *P. citrinum* colonies on DG18, MEA, CA and CYA (from left to right).

CIT was mainly detected from all of ten strains of *P. citrinum* (figure 4) (approximate 70000 ng CIT/g medium), from 3 of 5 *A. niger* strains (Figure 5) (approximate 50 ng CIT/g medium) and also from all of *A. parasciticus* strains (approximate 15 ng CIT/g medium).

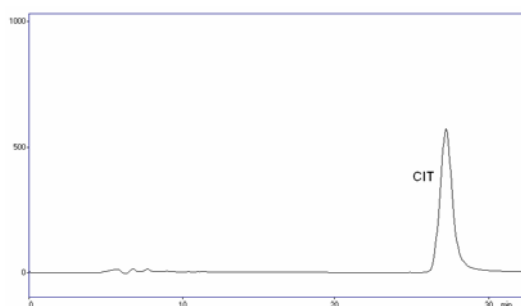


Figure 4: Chromatogram of CIT from CA cultured *P. citrinum* strain.

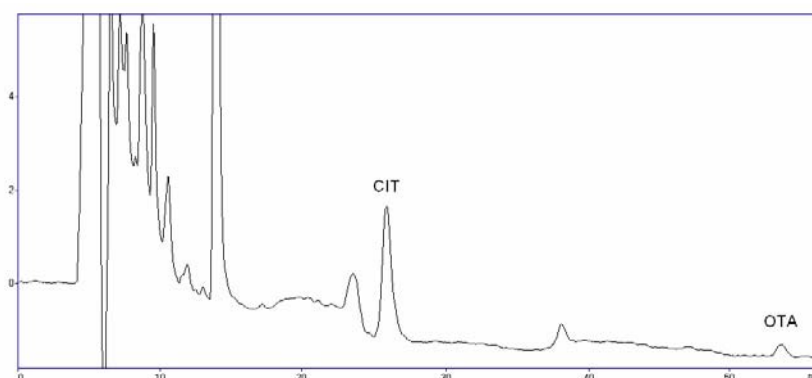


Figure 5: Chromatogram of CIT and OTA from CYA cultured *A. niger* strain.

OTA – Producing Strains

OTA was detected from three of five isolated *A. niger* strains (Figure 5). In the all medium used for *A. niger*, CYA and CA were better than others. But OTA concentration was very low (less than 1 ng/g medium).

Due to the climate of Vietnam and the bad storage of commercial rice, the seasonal affects on the mycoflora of rice samples from markets in five provinces of the central region of Vietnam. In the rainy season the levels of fungi contamination is higher than in the season. *A. parasiticus* was isolated from 60% samples in the rainy season. These strains produced AFB1. This represents a high risk for the consumers. CIT was detected from *P. citrinum* and *A. niger* (the contaminated ratio was 50% and 7% of the examined samples, respectively); and OTA was detected from some strains of *A. niger*. It is also a risk for consumers. Therefore, some further studies will be done to determine optimal storage conditions for commercial rice in the region above.

References

- 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.
- DAN, D.N. & DAC, P.T. (1993) Vietnam climate. *Science and Technology Publication*, Hanoi, pp. 44-50, 200-205.
- DAVIS, N.D., IYER, S.K. & DIENER, U.L. (1987) Improve method of screening for Aflatoxin with a Coconut agar medium. *Applied and environmental Microbiology*, pp. 1593-1595.
- DYER, S. K. & MCCAMMON, S. (1994) Detection of toxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and related species on coconut cream agar. *J. Appl. Bacteriol.* **76**:75–78.
- JAYARAMAN, P. & KALYANASUNDAMA, I. (1990) Natural occurrence of mycotoxigenic fungi and mycotoxin in rice bran. *Mycophatogia* **110**: 88-85.
- JAYARAMAN, P. & KALYANASUNDAMA, I. (1994) Changes in storage mycoflora of parboiled rice through difference stages of processing. *J. Food Sci. Techol.* **31**: 219-224.
- LIN, M. T. & J. C. DIANESE (1976) A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus spp.* *Phytopathology* **66**:1466–1469.

- LUAT, N.V. (2003) Vietnam rice plants in the 20th century. *Agriculture Publication*, Hanoi, pp. 174-176.
- OMINSKI, K.H., MARQUARDT, R.R., SINHA, R.N. & ABRAMSON D. (1994). Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. In J. D. Miller, & H. L. Trenholm (Eds.), *Mycotoxins in grain* (pp. 287–312). St Paul, MN: *Eagan Press*.
- PITT, J.I., HOCKING, A.D., BHUDHASAMAI, K., MISCAMBLE B.F. WHEELER, KA & TANBOON, E.K.P (1994) The normal grains and other commodities from Thailand 2. Beans, rice, small grains and other commodities. *Int. J. Food Microbiol.* **23**: 35-53.
- PITT, J.I. & HOKING, A.D. (1977) Fungi and Food Spoilage. *Blackie Academic & Professional*.
- SHOTWELL, O.L., HESSELTINE, C.W., STUBBLEFIELD, R.D. & SORENSON, W.G. (1966) Production of aflatoxin on rice. *App. Microbiol*, **14**: 425-428.
- WU, W.S. & DOW, S.K., (1993) A survey of rice seal-born fungi in Taiwan. *Plant Pathol. Bull* **2**: 52-55.

Article 3:

EFFECT OF RELATIVE HUMIDITY OF THE AIR AND TEMPERATURE ON AFLATOXIN B1 PRODUCTION OF *A. PARASITICUS* IN RICE

Abstract

The effect of the relative humidity of the air on the aflatoxin B1 (AFB1) production of *Aspergillus parasiticus* was examined in the present study. Relative humidity of the air of 75, 79, 85 and 90% was obtained by the help of saturated solutions of NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KCl and BaCl_2 , respectively. After 4 weeks, under conditions of relative humidity of 90% and temperature 25/30°C, AFB1 was detected. Minimal water activity at that AFB1 can be detected was 0.75, correspondent the moisture content of 13.58%. Polyethylene bag under vacuum or not can be used to avoid absorption of water from the moist air, and AFB1 was not detected after 10 months in this rice with moisture content of 13%.

1. Introduction

Rice is the staple diet in a significant part of the world, particularly in Asia (Luat, 2003). The structure and chemical composition of this cereal grain make it an ideal substrate for the establishment and growth of fungal species, especially toxigenic fungi that secrete mycotoxins including Aflatoxin (Shotwell, 1966).

In Vietnam, local commercial rice has been badly stored, and it has been sold without packing, it is directly exposed to the moist warm air. Clearly, the rice will absorb water vapour and the moisture content will consequently increase (Multon, 1997). Under such conditions, mould may multiply and possibly produce mycotoxins. Due to the acute or chronic toxicity of mycotoxins, their presence in food is of considerably concern to the consumers' health.

Contamination of aflatoxin B1 (AFB1) was mainly found in samples of rice collected in big markets in five provinces of central region in Vietnam.

Strains of *Aspergillus parasiticus* were also isolated from these samples, and they were responsible for the presence of AFB1 in the rice of this region.

In order to preserve the rice, fungal growth and thus mycotoxine production, especially AFB1, must be prevented. Water activity (a_w) and temperature are two of the most important environmental factors to control development of fungi and to affect their metabolic activities (Gqaleni, 1997).

The aim of the present work was to study the influence of a_w on the presence of AFB1 in rice in experimental conditions resembling storage environment and to determine the limiting a_w values for the biosynthesis of this mycotoxin. On then basis of this information proper storage conditions can be proposed.

2. Materials

2.1. Chemicals:

All reagents (sodium chloride, potassium chloride, barium chloride, ammonium sulphate, phosphoric acid, hydrochloric acid) were of PA grade. All solvents (methanol, acetonitrile, 2-propanol, n-hexane, chloroform) were of HPLC grade. Deionised water was used for the preparation of all aqueous solvents and for HPLC. Standard toxins AFB1 were supplied by Sigma Chemicals.

The rice used for testing was AFB1-free and its water activity and moisture content were 0.734 and 12.98 % (respectively) upon the initiation of the experiment.

2.2. Fungi

The strains of *A. parasiticus* used in this study were isolated from rice-samples from 5 provinces (Quang Nam, Quang Ngai, Binh Dinh, Phu Yen, and Nha Trang) of the central region in Vietnam. They produce aflatoxin B1 on Coconut Agar (Davis, 1987; Dyer, 1994).

3. Procedure

3.1. Water activity

Water activity was measured on an electronic hygrometer of model Hygrolab 3 w/o 39746, Votronic instrument Corp, Switzerland.

3.2. Moisture content

In a cooled and weighed bowl provided with a cover, previously heated to $130 \pm 3^\circ\text{C}$, accurately weigh about 10 grams. Uncover sample, and dry bowl, cover, and maintain 2 hours in an oven provided with opening for ventilation and maintained at $130 \pm 3^\circ\text{C}$. Cover bowl while still in oven, transfer to desiccator's, and weigh soon after reaching room temperature. Percent lost weight per original weight is defined as the moisture content.

3.3. Extraction, purification and quantification of toxins

Extraction

20g ground uncoated rice was extracted with 100 ml of acetonitrile-4% aqueous solution of potassium chloride (9:1). This mixture was adjusted to pH 1.5 with undiluted hydrochloric acid, and then shaken on an orbital shaker for 20 min, and finally filtered through a Whatman No. 4 under vacuum.

Purification

One hundred ml of n-hexane was added to the filtrate and shaken 10 min. After separating, the upper phase (n-hexane) was discarded. This step was repeated with fifty ml of n-hexane. To the lower phase, 50 ml deionised water and 50 ml chloroform were added. The solution was shaken for 10 min. After separation, the lower phase (chloroform) was collected. The upper phase was re-extracted two times with 25 ml aliquots of chloroform, using the above described conditions. The chloroform extracts were then pooled. Then the chloroform was evaporated to near dryness under vacuum using a rotary evaporator in a 40°C water bath at low speed. Two ml of methanol were added and the solution was sonicated and filtered through $0.45\ \mu\text{m}$ filter, and finally evaporated to dryness under a flow of nitrogen. For analysis in the HPLC system, $500\ \mu\text{l}$ of methanol were added.

HPLC conditions

A Shimadzu (Kyoto, Japan) LC-10 equipped with an injector 20 µl loop, a C18 spherisorb column (3µm C18, 0.46 x 25 cm) and a fluorescence detector (Spectra physic 2000) was used. Excitation (365 nm) and emission (440 nm) fluorescence parameters were optimal for detection of AFB1. The system was run isocratically, with a mobile phase of H₃PO₄ (0.33 M)/ acetonitrile/ propanol-2 (650/400/50); flow rate was 0.5 ml/min; elution time of AFB1, CIT and OTA was about 14, 28 and 56 min, respectively.

The chromatograms were analyzed by a Class-LC10 software version 1.6 Shimadzu.

3.4. Experimental schedule

Relative humid of 75, 79, 85, 90 % were prepared by saturated solutions of NaCl, (NH₄)₂SO₄, KCl, BaCl₂ (respectively) (Rockland, 1960; Adams *et al.*, 2002)

10⁴ spores of *A. parasiticus* from Czapek Yeast Extract Agar were added each 20 g of rice and stored in various conditions of relative humid (75, 79, 85, 90 %) and temperature (25°C, 30°C).

Each test was repeated 2 times. Average values were used.

4. Results and discussion

4.1. The change of water activity and moisture content of the rice during the storage

The rice is directly exposed to the moist air; it will absorb water from the air with high relative humid. The change of water activity and moisture content of the rice during the storage is presented in Table 1. and Fig. 1.

Table 1: The change of water activity and moisture content of the rice during the storage under different RH.

Time (weeks)	RH 75%		RH 79%		RH 85%		RH 90%	
	Water Content (%)	a_w	Water Content (%)	a_w	Water Content (%)	a_w	Water Content (%)	a_w
0	12.98	0.734	12.98	0.734	12.98	0.734	12.98	0.734
2	13.37	0.751	13.80	0.778	14.21	0.799	15.06	0.824
4	13.39	0.753	14.09	0.792	14.75	0.819	15.83	0.864
6	13.45	0.759	14.24	0.789	14.93	0.817	16.48	0.863
8	13.51	0.750	14.30	0.783	14.98	0.81	16.84	0.875
10	13.54	0.754	14.31	0.789	15.09	0.816	17.09	0.872
12	13.51	0.745	14.30	0.781	15.12	0.813	17.11	0.869
14	13.50	0.75	14.31	0.785	15.12	0.818	17.13	0.874

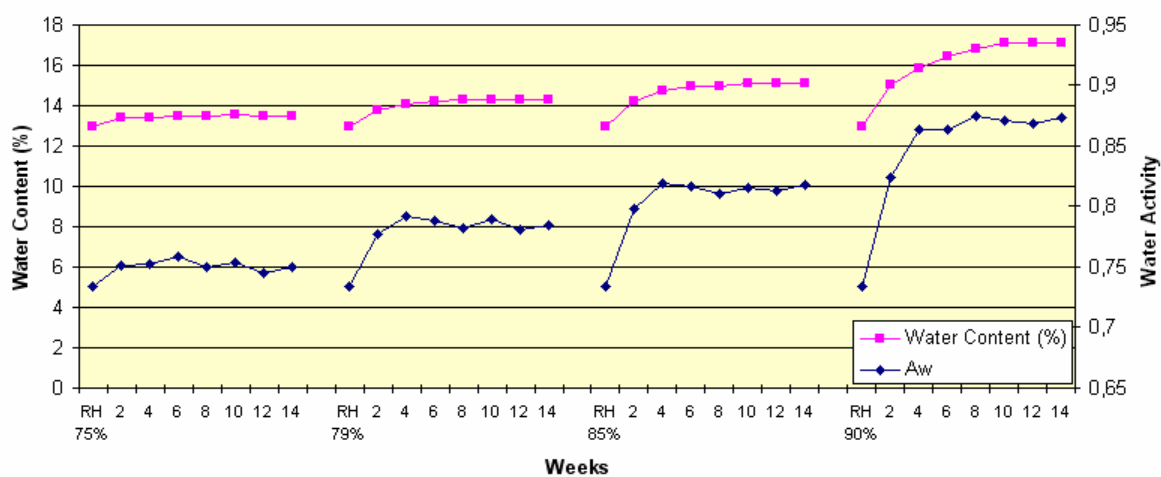


Fig. 1: The change of water activity and moisture content of the rice during the storage under different RH.

4.2. Aflatoxin B1 production

Each 2 weeks, sub samples of the rice was collected and analyzed for AFB1. The results are presented in Table 2 and Figure 2.

The rice absorbs the water from the air, so its moisture content and water activity increase. For RH 75%, after 2 weeks, the rice was up to a_w of 0.751, moisture content of 13.37%. For RH 79%, after 2 weeks, the rice was up to a_w of 0.78 and moisture content of 13.8%. In consequences, for RH 75% and 79%, they are not much different with initial a_w of 0.734; after only 2 weeks, the rice got to a_w near the highest level. Contrarily, for the relative humid too different with the initial a_w of rice, it requires more time for getting the highest levels. For RH 85%, after 4 weeks, it reached a_w of 0.819; and for RH 90%, after 4 weeks, reached a_w of 0.864. While the moisture content of rice required more time to reach the highest levels. After 2 weeks, both of them only reached a_w of 0.799 and 0.824.

Table 2: AFB1 (ng/g) in the rice under various storage conditions

Weeks	25°C					30°C				
	Control	RH 75%	RH 79%	RH 85%	RH 90%	Control	RH 75%	RH 79%	RH 85%	RH 90%
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	2.28	0	0	0	0	0.08
6	0	0	0	0	2.48	0	0	0	1.25	2.77
8	0	0	0	0		0	0	0		
10	0	0	0	0.33		0	0.12	0.12		
12	0	0.13	0.11	0.54		0	0.21	0.26		
14	0	0.19	0.21			0				

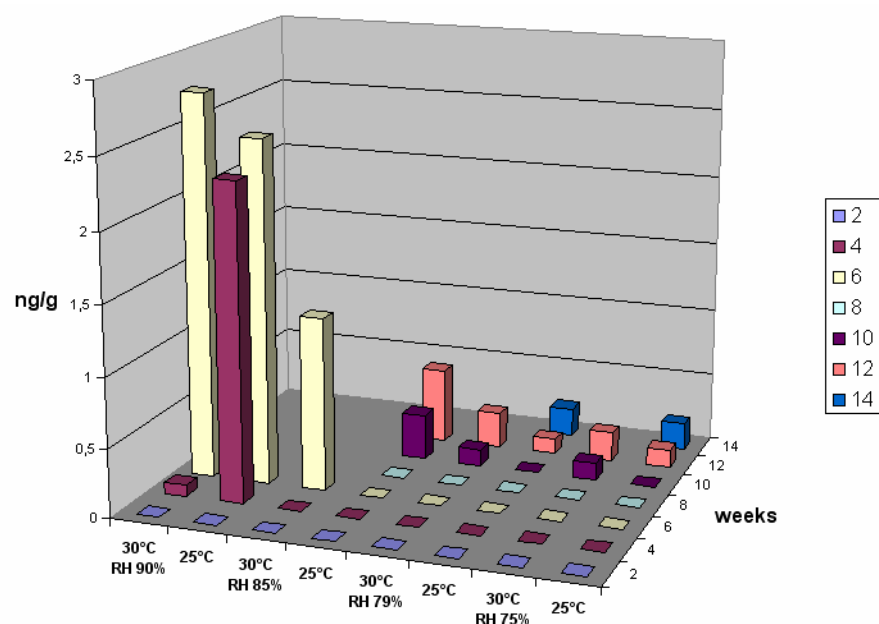


Fig. 2: AFB1 (ng/g) in the rice under various storage conditions

As can be seen at Table 2 and Figure 2, AFB1 was detected in the rice after 4 weeks in the RH 90%. Contrarily, in RH 85%, AFB1 was detected after 6 weeks at 30°C, and 10 weeks at 25°C. The temperature affects to AFB1-produce, in the low RH 79% and 75%, the time required was longer, from 10 to 12 weeks and at 30°C, the time was earlier than at 25°C 2 weeks. But AFB1 didn't detect in the control.

The effects of a_w and temperature on AFB1-production were examined on semi-synthetic media, not directly in the rice, so they can not reflect exactly these effects. The experimental design applied in this paper is approximate to the actual conditions in Vietnam, so the result can be applied for estimating conditions for storage.

Clearly, when the rice is exposed directly to the moist warm air, *A. parasiticus* develops and produces AFB1, especially at relative humidity of 90%, an average relative humid in the rainy season in some provinces of Vietnam.

The lowest water activity of the contaminated rice is 0.75 (table 1). This result is quite different with other authors. The lowest result of minimal a_w of 0.825 for AFB1 produce, but the amount of AFB1 is high (7.5 ppb) and after a

short time (7 days) (Bresler, 1998). The result in this paper was very low (LOQ), and was detected after a long time (12 weeks).

Base on the relation between the water activity and the moisture content of the rice (Fig. 3), we find the corresponding moisture content of an a_w of 0.75 to be 13.58%. Thus we choose the rice with moisture content of 13% added spores of *A. parasiticus* for checking AFB1 contamination after each two weeks.

Avoiding absorbing water from the moist air, the rice were added spores of *A. parasiticus* and packed in a polyethylene bag (gauge 0.08 mm) with vacuum of 90% or without vacuum.

Under this condition, we did not detect AFB1 after 10 month in any of 10 samples (5 samples at 25°C and 5 samples at 30°C).

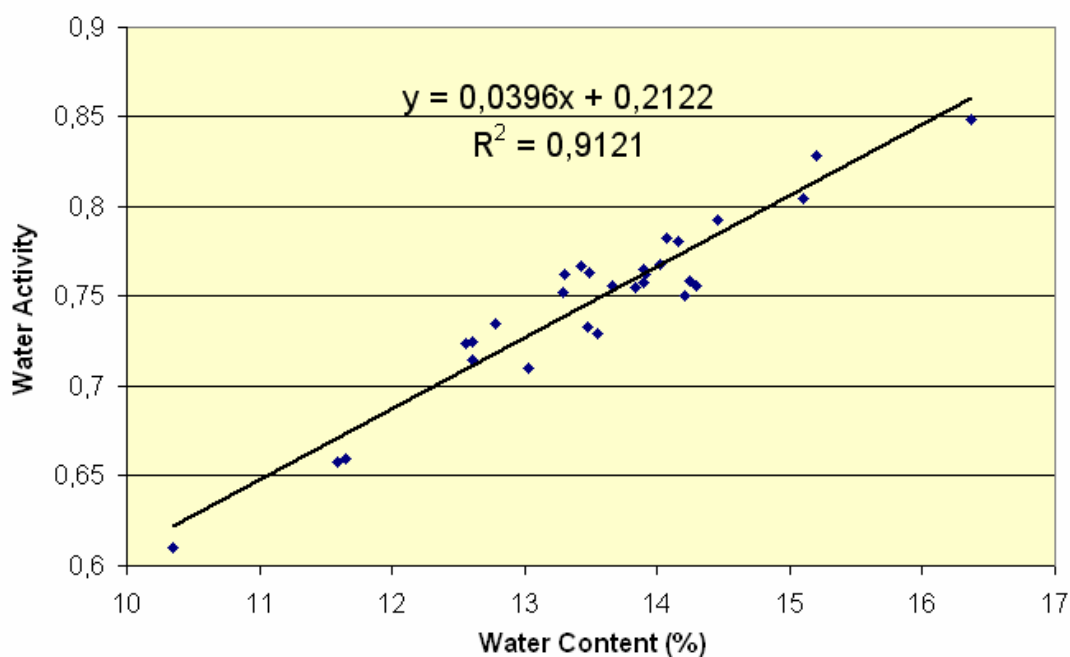


Fig 3: the relation between the water activity and the moisture content of the rice.

5. Conclusion

The relative humidity (RH) of the air effects highly the AFB1 production of *A. parasiticus*. After 4 weeks, under storage conditions with RH of 90% and temperatures of 25/30°C, AFB1 was detected.

The minimal water activity where AFB1 could be detected was 0.75, corresponding to a moisture content of 13.58%.

To avoid absorption of water from the moist air, polyethylene bags can be used under vacuum or not. Under such condition, AFB1 was not detected after 10 months in rice with a moisture content of 13%.

References

- ADAMS, M.R. & MOSS, M.O., (2002) Toxingenic Fungi in Food microbiology, RSC, UK, 46.
- BRESLER, G., VAAMONDE, G., DEGROSSI, C. & PINTO, V. F., (1998) Amaranth grain as substrate for aflatoxin and zearalenone production at different water activity levels. *International Journal of Food Microbiology* **42**: 57–61.
- DAVIS, N.D., IYER, S.K. & DIENER, U.L. (1987) Improve method of screening for Aflatoxin with a Coconut agar medium. *Applied and environmental Microbiology*, pp. 1593-1595.
- DYER, S. K., & S. MCCAMMON (1994) Detection of toxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and related species on coconut cream agar. *J. Appl. Bacteriol.* **76**:75–78.
- GQALENI, N., SMITH, J. E., LACEY, J. & GETTINBY, G. (1997) Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. *Applied and environmental microbiology*, **63** (3): 1048–1053.
- LUAT, N.V. (2003) Vietnam rice plants in the 20th century, *Agriculture publication*, Hanoi, pp. 174-176.

MULTON, J.L. (1997) L'état thermodynamique de l'eau dans les milieux biologiques et alimentaires", p4-14 dans un livre 'moisissures des aliments peu hydratés' Cahagnier B. (Coordinateur) *Tec et Doc*, 1997.

PITT, J.I. & HOKING, A.D. (1977). Fungi and Food Spoilage. *Blackie Academic & Profesional*.

ROCKLAND, L.B. (1960) Saturated salt solutions for static control of relative humidity between 5° and 40°C, *Anal. Chem.* **32**: 1375-1376.

SHOTWELL, O.L., HESSELTINE, C.W., STUBBLEFIELD, R.D. & SORENSON, W.G. (1966) Production of aflatoxin on rice. *App. Microbiol*, **14**: 425-428.

Résumé

Un grand nombre d'espèces de moisissures présentes dans l'air ambiant, sur le sol, les cultures sont capables, en se développant sur les denrées alimentaires, de synthétiser et excréter des mycotoxines à l'origine d'intoxications chez le consommateur. Au Vietnam, l'humidité et les températures élevées sont des facteurs favorisant la prolifération de moisissures productrices de mycotoxines. Le riz décortiqué vendu sur les marchés sans emballage adéquat est particulièrement exposé aux risques de contamination. L'objectif de ce travail a donc été d'identifier les espèces de moisissures productrices de mycotoxines dans le riz décortiqué commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam. Ceci est dans le but de réduire les taux de contamination par un meilleur contrôle des conditions de conservation du riz.

Les mycotoxines : aflatoxine B1 (AFB1), citrinine (CIT) et ochratoxin A (OTA) ont été recherchées dans des échantillons de riz collectés dans les grands marchés de cinq provinces de la région centrale du Vietnam par la technique de séparation par HPLC couplée à une détection par fluorimétrie. La contamination par l'AFB1 est la plus importante, suivie par l'OTA, tandis que la contamination par la CIT est insignifiante. Les teneurs de quelques échantillons en OTA et AFB1 dépassent les normes fixées en Europe pour les céréales.

Les moisissures présentes sur les échantillons de riz ont été identifiées. Le ratio de grains contaminés par les moisissures à la saison des pluies (18,7%) est plus élevé que celui à la saison sèche (13,5%). Les moisissures de stockage des genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Eurotium* sont majoritaires dans tous les échantillons examinés. A la saison des pluies, le pourcentage d'échantillons contaminés par *A. parasiticus* est élevé (60%). Ce pourcentage est de 54% pour *P. citrinum*, et de 7% pour *A. niger* ; le taux de co-contamination par *A. versicolor* et *A. parasiticus* est de 14%.

Les conditions de production des mycotoxines par les souches productrices ont été étudiées. Nous avons montré que l'humidité relative de l'air affecte grandement la production d'AFB1 par *A. parasiticus*. A un taux d'humidité relative de 75% (correspondant à l'activité de l'eau du riz de 0,75), l'AFB1, la CIT et l'OTA ont été détectées après 8-10 semaines de stockage. Un sac en polyéthylène (de calibre de 0,08 mm) a été utilisé afin d'éviter l'absorption par le riz de l'eau présente dans l'air. Les mycotoxines n'ont pas été détectées dans les échantillons de riz, après 10 mois à 25°C et 30°C, lorsque la teneur en eau est de 13% et à l'activité de l'eau de 0,734. Il en a été de même pour le riz dont la contamination avait été provoquée par des spores de souches mycotoxinogéniques.

Abstract

A large number of species of fungi present in the ambient air, on the ground or on the crops are able to develop on the foodstuffs where they synthesize and excrete the mycotoxins which are the origin of consumer's intoxications. In Vietnam, the moisture and the high temperature are factors supporting the proliferation of fungi producing mycotoxins. The uncoated rice sold on the markets without adequate package is particularly exposed with the contamination risks. The objective of this work thus was to identify the species of fungi producing mycotoxins in the rice sold in five provinces of the central region of Vietnam. This work is of an aim of reducing the rates of contamination by a better control of the conditions of rice storage.

Mycotoxins: aflatoxin B1 (AFB1), citrinin (CIT) and ochratoxin A (OTA) were detected in the samples of rice collected in big markets in five provinces of the central region of Vietnam by the technique of HPLC with fluorimetric detection. Contamination of AFB1 was found to be the most prevalent one, followed by OTA, while contamination of CIT was insignificant. The contents of OTA and AFB1 of some samples overpassed the maximal limit set in Europe for cereals.

The fungi present in the samples of rice were identified. The ratio of grains with fungi contamination in the rainy season (18.7%), was higher than the corresponding ratio observed in the dry season (13.5%). Storage fungi in the genera *Penicillium*, *Aspergillus* and *Eurotium* were dominant in all examined samples. In the rainy season, the ratio of samples contaminated by *A. parasiticus* was high (60%). In the fifty samples, there were 54% contaminated by *P. citrinum*, and 7% contaminated by *A. niger*, specially the co-contamination of *A. versicolor* and *A. parasiticus* was 14%.

The conditions of production of the mycotoxins by the producing strains were studied. We showed that the relative humidity of air affects the production of AFB1 by *A. parasiticus*. With a relative humidity of 75% (corresponding to the activity of the water of the rice of 0.75), the AFB1, the CIT and the OTA were detected after 8-10 weeks of storage. A polyethylene bag (gauge 0.08 mm) is used to avoid absorption of water from the moist air. Mycotoxins were not detected in the samples of rice, after 10 months at 25°C and 30°C, when the water content and water activity are of 13% and 0.734, respectively. The same result is obtained with the rice added spores of the mycotoxin-producing strains.