

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES ABREVIATIONS	4
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	5
INTRODUCTION GENERALE	8
REVUE DE LA BIBLIOGRAPHIE	12
1- CACAO	13
1-1- Eléments de botanique	13
1-2- Ecologie du cacaoyer	13
1-3- Les principaux types de cacaoyers cultivés	14
1-3-1- Groupe des Criollo	15
1-3-2- Groupe des Forastero Amazoniens	15
1-3-3- Groupe Trinitario	15
1-4- Fruit du cacaoyer	16
1-5- Certains constituants chimiques du cacao	17
1-5-1- Théobromine	17
1-5-2- Caféine	18
1-5-3- Epicatéchine	18
1-6- Récolte et préparation du cacao marchand	19
1-6-1- Récolte des cabosses	19
1-6-2- Ecabossage	19
1-6-3- Fermentation	20
1-6-4- Séchage	23
1-7- Cas spécifique du Cameroun	25
2- MYCOTOXINES ET MYCOTOXINOGENESE	28
2-1- Mycotoxines	28
2-2- Mycotoxinogénèse	30
2-2-1- Facteurs physiques	30
2-2-2- Facteurs chimiques	31
2-2-3- Facteurs biologiques	32
3- OCHRATOXINE A	33
3-1- Structure chimique et propriétés physico-chimiques	33
3-2- Toxicologie de l'OTA	34
3-3- OTA dans les aliments	35
3-4- OTA et cacao	38
3-4-1- Occurrence de l'OTA dans le cacao et produits dérivés	38
3-4-2- Estimation de la consommation de l'OTA à partir du cacao	39
3-5- Législation sur l'OTA	40
4- MOISSURES PRODUCTRICES DE L'OCHRATOXINE A	42
4-1- Généralités sur les moisissures	42
4-2- Grands groupes producteurs d'OTA	43
4-3- Moisissures productrices de l'OTA dans le cacao	43
4-4- <i>Aspergillus</i> noirs de la section <i>Nigri</i>	44
4-5- Approche génotypique	45

MATERIEL ET METHODES	50
MATERIEL	51
1- CACAO	51
2- SOUCHES FONGIQUES	51
METHODES	52
1- FERMENTATIONS DU CACAO	52
2- ETUDE DE LA MICROFLORE FONGIQUE	53
2-1- Echantillonnage	53
2-2- Milieux de culture	55
2-3- Numération par ensemencement des milieux en surface	56
2-4- Conditions de l'essai avec inoculation	57
2-5- Ensemencement direct	57
3- IDENTIFICATION DES MOISSURES	57
3-1- Caractères culturels sur milieu PDA	57
3-2- Caractères morphologiques microscopiques	58
4- ETUDE DE LA PRODUCTION ET DOSAGE DE L'OTRATOXINE A	58
4-1- Production d'OTA sur milieux gélosés	58
4-2- Production d'OTA sur milieu riz (Méthode FDA)	59
4-3- Production d'OTA sur milieu cacao	59
4-4- Dosage de l'OTA dans les fèves de cacao	59
5- TECHNIQUES D'ETUDE DES FACTEURS INFLUANT LA CROISSANCE ET LA PRODUCTION D'OTA	60
5-1- Incidence de l'activité de l'eau	60
5-2- Effet des alcaloïdes	60
6- TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	61
6-1- Production du mycélium	61
6-2- Extraction de l'ADN	61
6-3- Purification de l'ADN par Geneclean	62
6-4- Détermination des Aspergillus noirs	63
6- 4- 1- PCR avec des amorces spécifiques	63
6- 4- 2- Séquençage du fragment amplifié	64
6- 4- 3- Amplification partielle d'un fragment PKS	64
6-5- RAPD-PCR	65
6-6- Construction des dendrogrammes	65
RESULTATS	66
1- ETUDE DE LA MICROFLORE FONGIQUE ET DES ASPERGILLUS NOIRS PENDANT LE TRAITEMENT DU CACAO	67
1-1- Campagne cacaoyère 2005	68
1-1-1- Evolution qualitative de la microflore fongique	68
1-1-2- Evolution quantitative de la microflore fongique	70
1-1-3- Etude du taux de contamination des fèves de cacao par les moisissures	72
1-2- Campagne cacaoyère 2006	74
1-2-1- Etude de la microflore fongique au cours du traitement	74
1-2-2- Etude du taux de contamination des fèves	75
1-2-3- Etude de la microflore fongique au cours du stockage	76
1-3- Campagne cacaoyère 2007	78

1-3-1- Etude de la microflore fongique au cours des traitements	78
1-3-2- Etude du taux de contamination des fèves	80
1-3-3- Microflore fongique de l'environnement	81
1-4- Discussion	81
2- ETUDE DE LA PRODUCTION D'OCRATOXINE A	83
2-1- Production d'OTA par les moisissures isolées	83
2-2- Teneur en OTA des fèves de cacao	85
2-3- Discussion	88
3- INCIDENCE DES FACTEURS CHIMIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX SUR LA CROISSANCE ET LA PRODUCTION DE L'OCRATOXINE A DANS LE CACAO	91
3-1- Influence de l'activité de l'eau sur la croissance et la toxinogénèse	91
3-1-1- Chez <i>Aspergillus niger</i> agg	92
3-1-2- Chez <i>Aspergillus carbonarius</i>	93
3-2- Influence de certains alcaloïdes et de l'épicatéchine sur la croissance et la toxinogénèse	95
3-2-1- Caféine	96
3-2-2- Théobromine et épicatéchine	97
3-3- Discussion	99
4- ETUDE DE LA BIODIVERSITE DES ASPERGILLUS NOIRS	102
4-1- Etude phénotypique et choix des souches	102
4-1-1- <i>A. niger</i> aggregate	102
4-1-2- <i>A. carbonarius</i>	102
4-2- Etude génotypique	105
4-2-1- Extraction et purification de l'ADN génomique	105
4-2-2- Identification des <i>Aspergillus</i> noirs	105
4-3- RAPD - PCR	110
4-4- Traçabilité de la souche inoculée lors de la campagne 2006	111
4-5- Discussion	112
4-5-1- Présentation globale de la diversité et relation avec l'OTA	112
4-5-2- Incidence des paramètres environnementaux et post-récolte sur la biodiversité chez <i>A. niger</i> agg	114
4-5-3- Incidence des paramètres environnementaux et post-récoltes sur la biodiversité chez <i>A. carbonarius</i>	117
CONCLUSION GENERALE	119
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	125
ANNEXES	145

LISTE DES ABREVIATIONS

A_w	Activité de l'eau
ADN	Acide désoxy-ribonucléique
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ARN	Acide ribonucléique
agg	Aggregate
CIRAD	Centre international de recherche Agronomique pour le Développement
CYA	Milieu de culture Czapeck yeast extract agar
DG18	Milieu dichlorane glycérol
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent
FAO	Organisation pour l'Agriculture et l'Alimentation
FDA	Food and Drug Administration
g	gramme
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IARC	International Agency for Research on Cancer
ISO	Organisation internationale de Normalisation
IUPAC	Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée
j	Jour
JEFCA	Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires
kg	Kilogramme
μ g	Microgramme
MEA	Malt Extract Agar
min	Minute
mL	Millilitre
MULC	Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain
nd	Non détectable
ng	Nanogramme
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OTA	Ochratoxine A
OTB	Ochratoxine B
OT α	Ochratoxine α
PBS	Solution saline de phosphate tamponée
PCR	Polymerase chain reaction
PDA	Milieu de culture Gelose pomme de terre
pH	Potentiel d'Hydrogène
qsp	Quantité suffisante pour
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SCF	Comité Scientifique pour les Aliments de la Commission européenne
SCOOP	Groupe de Coopération Scientifique
T	Température
UFC	Unité Formant Colonie
V	volume
%	Pourcentage

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

Liste des Tableaux

1^{ère} partie : Revue de la bibliographie

- Tableau 1 : Espèces fongiques toxigènes contaminantes des denrées alimentaires et mycotoxines associées
- Tableau 2 : Teneur en OTA dans quelques produits alimentaires
- Tableau 3 : Occurrence de l'OTA dans le cacao provenant de plusieurs pays producteurs
- Tableau 4 : Teneur moyenne en OTA dans le chocolat et les produits à base de cacao en Espagne et dans 15 autres pays
- Tableau 5 : Normes établies sur certaines denrées alimentaires
- Tableau 6 : Caractéristiques des *Aspergillus* noirs
- Tableau 7 : Comparaison des séquences partielles ITS₂ de quelques *Aspergillus* noirs

3^{ème} partie : Résultat

- Tableau 8 : Identification de la microflore fongique isolée pendant les traitements technologiques
- Tableau 9 : Quantification des moisissures totales et moisissures noires isolées pendant les traitements technologiques (campagne 2005)
- Tableau 10 : Taux de contamination des fèves par les moisissures totales et les moisissures noires (campagne 2005)
- Tableau 11 : Microflore fongique isolée pendant les traitements technologiques (campagne 2006)
- Tableau 12 : Quantification des moisissures totales et moisissures noires isolées pendant la campagne cacaoyère 2006
- Tableau 13 : Taux de contamination par les moisissures totales et les moisissures noires
- Tableau 14 : Identification de la microflore fongique isolée pendant le stockage (campagne cacaoyère 2006)
- Tableau 15 : Evolution quantitative des moisissures totales et moisissures noires pendant le stockage (campagne 2006)
- Tableau 16 : Identification de la microflore fongique isolée pendant le traitement technologique (campagne 2007)
- Tableau 17 : Quantification des moisissures totales et moisissures noires isolées (campagne 2007)
- Tableau 18 : Taux de contamination par les moisissures totales et les moisissures noires (campagne 2007)
- Tableau 19 : Production d'OTA par les moisissures isolées lors des différentes campagnes cacaoyères en fonction du milieu de culture (souches sélectionnées comme étant les plus productrices sur PDA)
- Tableau 20 : Teneur en OTA dans le cacao marchand issu de la campagne cacaoyère 2005
- Tableau 21 : Teneur en OTA dans le cacao marchand issu de la campagne cacaoyère 2006
- Tableau 22 : Teneur en OTA dans le cacao marchand issu de la campagne cacaoyère 2007
- Tableau 23 : Conditions de développement et de production d'OTA chez quelques moisissures productrices d'OTA
- Tableau 24 : Les différents groupes phénotypiques chez *A. niger* agg sur milieu PDA
- Tableau 25 : Souches d'*A. niger* agg associées aux groupes phénotypiques sur milieu PDA
- Tableau 26 : Les différents groupes phénotypiques chez *A. carbonarius* sur milieu PDA
- Tableau 27 : Souches d'*A. carbonarius* associées aux groupes phénotypiques sur milieu PDA
- Tableau 28 : Origine des souches d'*A. niger* agg et d'*A. carbonarius* étudiées en biologie moléculaire
- Tableau 29 : PCR spécifiques avec l'*A. niger* agg 20

Liste des Figures

1^{ère} partie : Revue de la bibliographie

- Figure 1 : Branche du cacaoyer chargée en fruits (cabosses)
Figure 2 : Les fèves de cacao
Figure 3 : Structure de la théobromine
Figure 4 : Structure de la caféine
Figure 5 : Structure de l'épicatéchine
Figure 6 : Récolte des cabosses
Figure 7 : Ecabossage
Figure 8 : Diagramme simplifié de la fermentation du cacao
Figure 9 : Mise en fermentation des fèves
Figure 10 : Séchage solaire
Figure 11 : Séchoir de type « autobus »
Figure 12 : Séchoir artificiel de type « Samoa »
Figure 13 : Principaux pays producteurs de fèves de cacao en 2008
Figure 14 : Les grands bassins de production cacaoyère au Cameroun
Figure 15 : Structure de l'ochratoxine A
Figure 16 : Contribution des différents aliments à l'ingestion de l'OTA en Europe

2^{ème} partie : Matériel et Méthodes

- Figure 17 : La localisation de la zone étude : la région de Kumba, située dans le Sud-Ouest du Cameroun
Figure 18 : Traitements post-récolte étudiés pendant la campagne cacaoyère 2005
Figure 19 : Traitements post-récolte étudiés pendant la campagne cacaoyère 2006
Figure 20 : Traitements post-récolte étudiés pendant la campagne cacaoyère 2007

3^{ème} partie : Résultat

- Figure 21 : Moisissures isolées au cours des traitements technologiques
Figure 22 a : Croissance d'*A. niger* agg 13 en fonction de l' A_w et de la durée d'incubation
Figure 22 b : Toxinogénèse d'*A. niger* agg 13 en fonction de l' A_w et de la durée d'incubation
Figure 23 a : Croissance d'*A. carbonarius* 14 en fonction de l' A_w et de la durée d'incubation
Figure 23 b : Toxinogénèse d'*A. carbonarius* 14 en fonction de l' A_w et de la durée d'incubation
Figure 24 a : Croissance d'*A. carbonarius* 15 en fonction de l' A_w et de la durée d'incubation
Figure 24 b : Toxinogénèse d'*A. carbonarius* 15 en fonction de l' A_w et de la durée d'incubation
Figure 25 a : Croissance d'*A. carbonarius* 38 en fonction de l' A_w et de la durée d'incubation
Figure 25 b : Toxinogénèse d'*A. carbonarius* 38 en fonction de l' A_w et de la durée d'incubation
Figure 26 : Croissance et toxinogénèse d'*A. niger* 13 en fonction de la teneur en caféine du milieu
Figure 27 a : Croissance et toxinogénèse d'*A. carbonarius* 14 en fonction de la teneur en caféine du milieu
Figure 27 b : Croissance et toxinogénèse d'*A. carbonarius* 15 en fonction de la teneur en caféine du milieu
Figure 28 : Croissance et toxinogénèse d'*A. niger* 13 en fonction de la teneur en théobromine du milieu
Figure 29 a : Croissance et toxinogénèse d'*A. carbonarius* 14 en fonction de la teneur en théobromine du milieu
Figure 29 b : Croissance et toxinogénèse d'*A. carbonarius* 15 en fonction de la teneur en théobromine du milieu
Figure 30 : Croissance et toxinogénèse d'*A. niger* 13 en fonction de la teneur en épicatéchine du milieu

- Figure 31 a : Croissance et toxinogénèse d'*A. carbonarius* 14 en fonction de la teneur en épicatechine du milieu
- Figure 31 b : Croissance et toxinogénèse d'*A. carbonarius* 15 en fonction de la teneur en épicatechine du milieu
- Figure 32 : Electrophorèse des ADN génomiques après purification par Geneclean
- Figure 33 : Electrophorèse de l'amplification par PCR spécifique avec primer ITS₁/NIG
- Figure 34 : Electrophorèse de l'amplification par PCR spécifique avec le primer ITS₁/TUB
- Figure 35 : Electrophorèse de l'amplification par PCR spécifique avec le primer ITS₁/CAR
- Figure 36 : Electrophorèse de la PCR spécifique avec les primers Ac12RL-OTAF/ Ac12RL-OTAR
- Figure 37 : Exemple de profils d'amplification par RAPD-PCR avec l'OPC 08 chez *A. niger agg*
- Figure 38 : Exemple de profils d'amplification par RAPD-PCR avec l'OPC 13 chez *A. carbonarius*
- Figure 39 : Etude de la traçabilité de l'*A. niger agg* 18
- Figure 40 : Dendrogramme global chez *A. niger agg*
- Figure 41 : Dendrogramme global chez *A. carbonarius*
- Figure 42 : Dendrogramme des *A. niger agg* par année de campagne cacaoyère
- Figure 43 : Influence du type de traitement sur la biodiversité des *A. niger agg*
- Figure 44 : Influence du degré de transformation des fèves de cacao sur la biodiversité des *A. niger agg*
- Figure 45 : Influence des paramètres environnementaux et post-récolte sur la biodiversité chez *A. carbonarius*

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le cacao occupe une place de choix dans l'économie mondiale : 3 740 000 tonnes/an pour environ 7,5 milliards de \$ (ICCO, 2008). L'Afrique seule fournit 70 % de la production mondiale, l'essentiel de la production étant assurée par des exploitations familiales ; elle est suivie de l'Asie (18 %) et de l'Amérique (12 %) où on peut trouver des grandes plantations (principalement au Brésil). Depuis 2005, l'exportation de fèves de cacao est en perpétuelle hausse. C'est ainsi près de 80 % de la production qui est exportée. Les principaux exportateurs de cacao sont les mêmes que les producteurs à l'exception du Brésil et de la Malaisie qui transforment une part non négligeable localement.

L'Ochratoxine (OTA) est un métabolite secondaire toxique produit par certaines moisissures essentiellement de genre *Aspergillus* dans les zones tropicales et *Penicillium* dans les zones tempérées (Larsen *et al.*, 2001 ; Castella *et al.*, 2002). L'OTA possède des effets néphrotoxiques, immunotoxiques, tératogènes et cancérigènes (Kuiper-Goodman et Scott, 1989 ; Mantle et McHugh, 1993 ; Kuiper-Goodman, 1996 ; Höhler, 1998 ; Pfohl-Leszczkowitz et Castegnaro, 1999). Les graves risques qu'elle engendre sur la santé des consommateurs ont conduit les instances sanitaires de l'Union Européenne à établir des normes qui définissent les limites maximales tolérables dans plusieurs denrées agricoles (céréales, raisins, café...). La norme sur le cacao est en cours d'élaboration.

Selon le comité scientifique de l'alimentation humaine, il est prudent de réduire l'exposition à l'OTA en dessous de 5 ng.kg^{-1} de poids corporel par jour.

Comme avec d'autres produits agricoles, il convient de déterminer les facteurs qui interviennent dans la formation de l'OTA dans les fèves de cacao afin de prendre des mesures préventives, en attendant l'établissement de la norme. Dans les conditions actuelles de la production cacaoyère par les pays producteurs, environ 30 % des lots exportés risquent d'être rejetés, avec des conséquences multiples. Pour les pays producteurs, cela se traduirait par une baisse de rentrée de devises, avec des répercussions économiques et sociales alarmantes. Pour les pays consommateurs, il peut y avoir pénurie, déséquilibre entre l'offre et la demande, créant une profonde crise sur l'économie de la filière (Gerrit et Stegen, 2003).

La présence de l'OTA dans les fèves de cacao est actuellement rapportée. Dès lors, plusieurs travaux ont été réalisés sur son devenir dans les produits à base de cacao. En général, un faible taux de contamination par l'OTA, dû au décorticage (Bonvehí, 2004), est obtenu dans les

produits manufacturés à base de cacao (CAOBISCO/ECA/FCC, 2003). La production de l'OTA peut intervenir pendant toute la durée du processus post-récolte, le stockage et le transport vers les pays importateurs. Les moisissures toxigènes associées au cacao varient en fonction de la provenance : *A. carbonarius* et *A. niger* ont été isolés d'un mélange de cacao de Côte d'Ivoire et du Nigéria (Amézqueta *et al.*, 2008), *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *P. verrucosum* ont été isolés d'un cacao d'origine inconnue (Brera *et al.*, 2003 ; Magan et Aldred, 2005).

L'influence du type de traitement post-récolte sur la microflore fongique totale et ochratoxinogène a été étudiée sur le café (Sùarez-Quiroz *et al.*, 2004b, 2005). Il est également connu que la production d'OTA par les souches toxigènes peut être fonction d'un certain nombre de facteurs dont l'humidité, la température et la nature du substrat (Sùarez-Quiroz *et al.*, 2004a ; Kokkonen *et al.*, 2005). L'influence de ces différents facteurs, ainsi que celle de la qualité intrinsèque des fèves (liées à leurs propriétés physico-chimiques : teneurs en caféine, théobromine, épicatechine) sur la toxigénèse reste à vérifier dans le cas du cacao. L'étude de l'incidence du type de traitement post-récolte utilisé (fermentation en tas ou en caisse) ainsi que l'état d'intégrité de la cabosse de cacao sur la microflore fongique totale et toxigène (et sa production d'OTA) est également à réaliser.

Les *Aspergillus* noirs de la section Nigri contaminent la plupart des denrées agricoles, dont le cacao (Gams *et al.*, 1985). La section Nigri regroupe une biodiversité importante qui reste difficilement dissociable, en particulier un groupe d'espèces très voisines regroupées sous le terme d'*Aspergillus niger* aggregate. A ce groupe appartiennent certaines espèces traditionnellement reconnues comme productrices d'OTA : *A. niger* et *A. carbonarius*, qu'il conviendrait de savoir distinguer des autres *Aspergillus* noirs. La taxonomie des *Aspergillus* noirs a déjà été étudiée sur les critères phénotypiques par plusieurs auteurs avec des résultats parfois contradictoires (Al-Musallam, 1980 ; Kozakiewicz, 1989 ; Kusters-Van *et al.*, 1991 ; Samson, 1992 ; Accensi *et al.*, 1999 ; Parenicova *et al.*, 2000, Samson *et al.*, 2004 ; Frisvad *et al.*, 2007 ; Geiser *et al.*, 2007 ; Perrone *et al.*, 2007 ; Samson *et al.*, 2007). Seule la combinaison des critères phénotypiques et moléculaires permet de faire une classification fiable.

Les objectifs du travail réalisé ont donc été les suivants :

- Etudier l'influence du type de traitement post-récolte sur la microflore fongique totale du cacao.
- Etudier l'influence du type de traitement post-récolte sur la microflore fongique toxigène et la production de l'OTA.
- Etablir l'influence de chaque étape de traitement post-récolte sur la microflore fongique toxigène et la production de l'OTA.
- Etudier l'incidence de l'intégrité de la cabosse et du délai d'écabossage sur la microflore fongique toxigène et la production de l'OTA.
- Etudier *in vitro* les conditions de développement et de toxinogénèse des souches isolées, en particulier l'incidence de l'activité de l'eau (A_w).
- Etudier l'incidence de la composition chimique des fèves de cacao (caféine, théobromine, épicatechine) sur la toxinogénèse.
- Proposer les moyens de prévention et de contrôle des moisissures toxigènes isolées du cacao
- Etudier la biodiversité des *Aspergillus* noirs isolés du cacao.
- Etablir d'éventuelles relations entre le génotype et la production de l'OTA
- Etudier l'incidence des paramètres environnementaux et post-récolte sur la biodiversité des *Aspergillus* noirs.

*REVUE DE LA
BIBLIOGRAPHIE*

1- CACAO

1-1- Eléments de botanique

Le cacao appartient à la famille des Sterculiacées, au genre *Theobroma*. L'espèce *cacao* est la seule cultivée pour la production des graines destinées à la préparation du chocolat ou à l'extraction du beurre de cacao (Pontillon, 1997 ; Lanaud, 1999 ; Wright, 1999).

Position systématique :

Ordre : Malvales

Famille : Sterculiacées

Tribu : Byttneriées

Genre : *Theobroma*

Espèce : *cacao*

Le genre *Theobroma* a été subdivisé en six sections regroupant vingt deux espèces par Cuatrecasas en 1964 (cité par Villeneuve, 1982). Les fèves de la plupart des espèces peuvent être utilisées en chocolaterie. Il s'agit de : *Theobroma cacao* (Figure 1), *T. grandiflora*, *T. bicolor*, *T. speciosa*, *T. microcarpa*.



Figure 1 : Branche du cacaoyer chargée en fruits (cabbosses)

1- 2- Ecologie du cacaoyer

La plante est cultivée dans la ceinture intertropicale, c'est-à-dire entre le 22° parallèle nord (Cuba) et le 21° parallèle sud (île de la Réunion). La plus grande zone de production se situe entre le parallèle 10° Nord et 10° Sud, à basse altitude (généralement inférieure à 500 m et

exceptionnellement en altitude). La température, la pluviosité et le sol jouent un rôle important.

Le cacaoyer exige une température relativement élevée, avec une moyenne annuelle située entre 30-32°C au maximum et 18-21°C au minimum. Les températures inférieures à 15°C bloquent la croissance et le développement du cacaoyer.

La variabilité du rendement des cacaoyers d'une année à l'autre peut être affectée par la pluviosité, le vent, les maladies et les pestes (ravageurs). Le cacaoyer est très sensible au déficit hydrique prolongé. Ce phénomène est plus particulièrement marqué lorsqu'il est en concurrence avec d'autres plantes d'ombrage ou d'adventice, ce qui est le cas le plus fréquent en plantation. Une pluviosité de 1500 à 2000 mm par an est généralement considérée comme favorable à condition toutefois que ces pluies soient bien réparties et qu'il n'y ait pas plus de trois mois de saison sèche (Wood et Lass, 1985 ; Despreaux, 1998).

Le cacaoyer est un arbre ombrophile. La culture traditionnelle a toujours été réalisée sous ombrage de forêts aménagées dans des sols neutres ou légèrement acides. Un ombrage provisoire est indispensable pendant les premières années de culture des jeunes cacaoyers. Cet ombrage provisoire doit être relativement dense, ne laissant passer que 50 % de la lumière totale au moins pendant deux années après la plantation. Il sera diminué progressivement au fur et à mesure du développement du cacaoyer, mais jamais avant la formation bien établie des couronnes (Mossu, 1990).

1- 3- Les principaux types de cacaoyers cultivés

Comme de nombreuses espèces répandues en Amazonie, le cacaoyer *Theobroma cacao* L. présente une très grande diversité. Cette diversité repose sur les caractéristiques morphologiques des cabosses ou des graines, qui présentent toutes une très grande variabilité. Seules les fleurs sont morphologiquement peu variables. On distingue trois grands groupes : les Criollo, les Forastero amazoniens et les Trinitario. De ces grands groupes sont nés par croisement des hybrides fertiles qui constituent la majorité des cultivars utilisés en plantation. Néanmoins, des problèmes d'auto-incompatibilités, sporophytiques et gamétophytiques, peuvent également être rencontrés. Le nombre de chromosomes chez *Theobroma cacao* L. est $2n = 20$.

1- 3- 1- Groupe des Criollo

Domestiqués depuis plusieurs siècles, les cacaoyers Criollo sont cultivés dans la zone méso-américaine (Mexique, Nicaragua, Guatemala, Colombie, Venezuela...), dans l'arc antillais, à Madagascar, Sri Lanka, Indonésie et aux îles Samoa.

Les Criollo représentent 1-5 % de la production mondiale. Ils sont caractérisés par des cabosses de forme allongée et de couleur rouge ou verte avant maturité. Leur péricarpe est verruqueux, mince, facile à couper. Le mésocarpe est mince et peu lignifié. Les fèves sont dodues, de section presque ronde, avec des cotylédons blancs ou peu pigmentés.

Les Criollo produisent un cacao fin, très aromatique, son amertume est légère. Ils sont utilisés en chocolaterie pour la production des produits de luxe. Malgré leurs très grandes qualités, ils ne sont pratiquement plus cultivés à cause de leur productivité limitée et leur grande sensibilité aux maladies (Pontillon, 1997 ; Despreaux, 1998).

1- 3- 2- Groupe des Forastero Amazoniens

Les cacaoyers Forastero sont originaires de la Haute Amazonie (Pérou, Equateur, Colombie), et se sont dispersés dans le bassin amazonien (Brésil) et en Afrique de l'Ouest.

Les Forastero amazoniens sont caractérisés par des fleurs qui présentent des staminodes pigmentées de violet. Les cabosses, de formes très variables, sont généralement de couleur verte puis jaune à maturité. Le péricarpe est morphologiquement dépendant du génotype, mais reste en général fortement lignifié. Les fèves fraîches, plus ou moins aplaties, présentent des cotylédons de couleur violette.

Ils sont aujourd'hui très largement cultivés dans les pays producteurs et fournissent plus de 80 % de la production mondiale de cacao.

Plusieurs cultivars de cacaoyer « Forastero » sont rencontrés, mais seuls deux types sont particuliers. Il s'agit du groupe ou du type cacaoyer « Nacional » de l'Equateur qui produit un cacao qui bénéficie d'une surcote sur le marché international et est considéré comme un « cacao fin » par opposition aux cacaos courants fournis par les autres Forastero. C'est également le cas du cacaoyer « Haut Amazonien » ou « Upper Amazon » et certains « Bas Amazoniens » de type Amelando.

1- 3- 3- Groupe Trinitario

C'est un groupe hybride issu du croisement entre Forastero et Criollo. Son caractère botanique est difficile à définir. Etant un groupe hybride, les Trinitario peuvent donner des cabosses lisses et rondes jusqu'à des cabosses allongées et verruqueuses. De couleurs allant

du blanc des Criollo au sombre des Forastero, les Trinitario fournissent des cacaos recherchés pour la fabrication des poudres. Aujourd'hui, les Trinitario sont cultivés dans tous les pays où furent autrefois cultivés les Criollo (Mexique et Amérique centrale, Trinidad, Venezuela, Colombie...). Ils sont présents également en Afrique et le Cameroun est le premier pays où les Trinitario ont été introduits massivement.

Les Trinitario représentent 10 à 15 % de la production mondiale (Pontillon, 1997 ; Despreaux, 1998).

1- 4- Fruit du cacaoyer

Le fruit du cacaoyer est appelé « chérelle » pendant la durée de sa croissance et de son développement puis « cabosse » lorsqu'il a sa taille définitive. Il atteint sa maturité après cinq à six mois selon les origines et les conditions climatiques. La cabosse pèse 200 g à plus de 800 g et contient 30 à 40 graines appelées fèves disposées en 5 rangées autour d'un axe ou rachis et entourées d'un mucilage ou pulpe (Figures 1 et 2).



Figure 2 : Les fèves de cacao

La graine de cacao, ou fève, mesure 2 à 3 cm de long, de 1 à 1,7 cm de largeur, de 0,7 à 1,2 cm d'épaisseur. Fraîche, elle est constituée d'une enveloppe mince, résistante, rosée, fortement nervurée, appelée tégument et d'une amande constituée par deux cotylédons fortement plissés, recouverts d'une très fine pellicule translucide brillante que représente les vestiges de l'endosperme. Les cotylédons sont réunis à la base par une radicule dont la longueur atteint 6 à 7 mm et une gemmule qui constitue le germe de la fève de cacao (Braudeau, 1969 ; Despreaux, 1998).

Les cotylédons sont constitués des cellules parenchymateuses de réserve qui sont très riches en matière grasse (45 à 60 % de la masse des graines séchées selon les origines), des cellules à pigments qui sont responsables de leur coloration. Ces cellules contiennent de nombreux polyphénols (tanins, catéchines, anthocyanines, leucoanthocyanine) et des purines (théobromine, caféine...). Les anthocyanines, communément appelées « rouge de cacao » ou

« pourpre de cacao » sont responsables de la coloration violette des cotylédons. Les tannins, de goût astringent, s'oxydent rapidement et fournissent des produits colorés appelés « brun de cacao ». La théobromine quant à elle est responsable de l'amertume du cacao (Mossu, 1990). La pulpe ou mucilage des fruits mûrs contient 80-87 % d'eau, 10-13 % de sucres constitués principalement de glucose et de fructose, 0,5 % d'acides non volatils (acide citrique en grande partie), d'amidon, de sels minéraux et 1 % de pectines (OFFEM, 1990 ; Jinap, 1993 ; Jinap, 1994).

1- 5- Certains constituants chimiques du cacao

Les fèves de cacao sont naturellement riches en alcaloïdes et polyphénols. Les alcaloïdes sont des molécules organiques hétérocycliques d'origine naturelle. Ils sont connus pour leurs activités biologiques. Les plus importants dans le cacao sont la caféine, la théobromine, qui sont des méthylxanthines, et l'épicatéchine, qui est un composé phénolique.

1- 5- 1- Théobromine

C'est la diméthyl-3,7 dioxo-2,6 tétrahydro-1,2,3,6 purine (Figure 3). Sa formule chimique est $C_7H_8N_4O_2$.

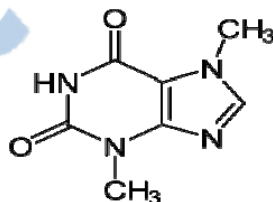


Figure 3 : Structure de la théobromine

La théobromine est présente dans le cacao et donc dans le chocolat dont elle est le principal alcaloïde. Elle est une des causes des effets positifs du chocolat sur l'humeur. Contrairement à la caféine, la théobromine est un stimulant doux à effet durable sur le corps humain. Elle agit en accélérant la transmission de l'influx nerveux et en diminuant le temps de réponse lors d'une stimulation des nerfs périphériques. En médecine, elle est utilisée comme diurétique, vasodilatateur et cardiostimulant. Elle stimule les muscles lisses, les fonctions rénales et améliore les performances musculaires. La théobromine diminue les effets du stress en bloquant les récepteurs à l'adrénaline.

Néanmoins, des conséquences néfastes peuvent résulter de son ingestion. La théobromine est un facteur aggravant les reflux acides gastro-oesophagiens. Responsable du relâchement des muscles du sphincter gastro-oesophagien, elle permet aux acides gastriques d'accéder à

l'œsophage. Ces reflux peuvent engendrer des lésions dangereuses pour la santé. On sait aussi que cet alcaloïde est soupçonné d'accroître les risques de cancer de la prostate (Spiller, 1998).

1- 5- 2- Caféine

La caféine, $C_8H_{10}N_4O_2$, ou 1,3,7-triméthylxanthine ou encore 3,7-dihydro-1,3,7-triméthyl-1H-purine-2,6-dione (Figure 4) est une molécule de la famille des méthylxanthines, qui comprend également la théophylline et la théobromine.

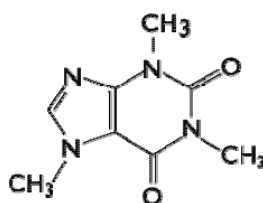


Figure 4 : Structure de la caféine

Originellement appelé « guaranine », la caféine est la substance la plus utilisée dans le monde en pharmacologie. Dans sa forme pure, elle consiste en une poudre blanche d'un goût extrêmement amer. Cette méthylxanthine est présente dans de nombreux aliments tels que les grains de café, le thé, la noix de kola, le cacao... C'est un stimulant rapide du système nerveux central ainsi que des systèmes cardio-vasculaire, respiratoire et gastro-intestinal. Cette action quasi instantanée est due au fait que son absorption est intégrale au niveau du tube digestif et que son arrivée au cerveau est estimée à 5 minutes seulement après son ingestion (Spiller, 1998).

1- 5- 3- Epicatéchine

C'est le flavanol spécifique du cacao (Figure 5).

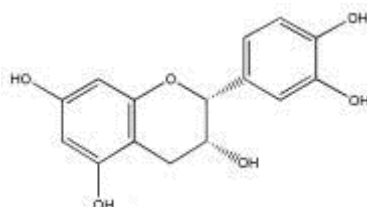


Figure 5 : Structure de l'épicatéchine

L'épicatéchine a des propriétés physico-chimiques importantes : pouvoir antioxydant, antiradicalaire, complexation des métaux, des macromolécules (protéines, polysaccharides) et

est responsable de nombreuses propriétés biologiques observées. Ceci est en relation directe avec sa structure polyphénolique. Il existe donc une importante relation entre structure et réactivité. C'est un composé actif qui a des propriétés anti-cancéreuses. Des études ont démontré l'inhibition du développement et de la progression du cancer de la prostate dans un modèle de souris transgénique, augmentant ainsi leur survie. L'épicatéchine améliore la relaxation des vaisseaux sanguins de manière comparable à ce que fait un médicament comme l'aspirine. Sa consommation est potentiellement cardio-protectrice (Shahidi and Naczki, 1995).

1- 6- Récolte et préparation du cacao marchand

Le cacao marchand, plus simplement appelé « cacao », est obtenu à partir des graines extraites des cabosses et ayant subi, immédiatement après récolte, deux opérations fondamentales qui sont la fermentation et le séchage.

1- 6- 1- Récolte des cabosses

De la pollinisation des fleurs jusqu'à la maturité des fruits, il faut en moyenne une période de cinq à six mois. La cabosse change alors de couleur, le vert virant au jaune, le rouge virant à l'orangé.



Figure 6 : Récolte des cabosses

La cueillette (Figure 6) est faite par section franche du pédoncule à l'aide d'une lame bien affûtée ou d'une machette. Pour les cabosses hautes, un émondoir monté à l'extrémité d'une longue perche est utilisé. La cueillette doit avoir lieu lorsque les cabosses sont bien mûres afin d'assurer un maximum de flaveur (Alvarado, 1983). Elle doit être faite de sorte à ne blesser ni la cabosse, ni la branche qui porte la cabosse (Mossu, 1990).

1- 6- 2- Ecabossage



Figure 7 : Ecabossage

L'écabossage (Figure 7) est l'opération qui consiste à ouvrir les cabosses pour extraire les graines. En général, il a toujours lieu dans la plantation ou en bordure de celle-ci. La méthode la plus simple est de frapper la cabosse contre le sol ou à l'aide d'un gourdin en bois qui provoque l'éclatement de la cabosse. L'usage d'outil tranchant (machette), bien que très répandu, est à proscrire afin de ne pas détériorer les graines.

1- 6- 3- Fermentation

La fermentation est l'étape primordiale du traitement post-récolte du cacao (Figure 8). La qualité finale du cacao y est étroitement liée (Biel, 1982 ; Barel, 1997). La fermentation résulte du métabolisme de plusieurs microorganismes inoculés naturellement pendant l'écabossage par l'environnement, les insectes, les mains des travailleurs ou le matériel utilisé (feuilles de bananiers, caisses de fermentation...). Elle a une durée variable qui est fonction du type de cacao, de son origine génétique, des conditions climatiques et de l'importance de la masse mise à fermenter (Lehrian, 1984). Pendant la fermentation, un accroissement de la température pouvant atteindre 46-48°C est observé au milieu de la masse de cacao. En général, le brassage intervient au bout de 48 heures et peut être renouvelé au besoin. Les quantités nécessaires pour la fermentation vont de quelques kilos à plusieurs tonnes, mais il est préférable de partir d'au moins 80 kg de fèves afin de minimiser les variations de température.

Le métabolisme microbien engendre une transformation des sucres en alcool, puis en acide acétique. A l'intérieur de la fève, il y a des modifications biochimiques qui entraînent une diminution de l'amertume et de l'astringence et préparent l'apparition des précurseurs d'arôme du cacao (Biehl, 1982 ; Barel, 1997). La mort de l'embryon qui s'en suit est à la fois un objectif et une conséquence des réactions chimiques qui ont lieu au cours de la fermentation (Figure 8).

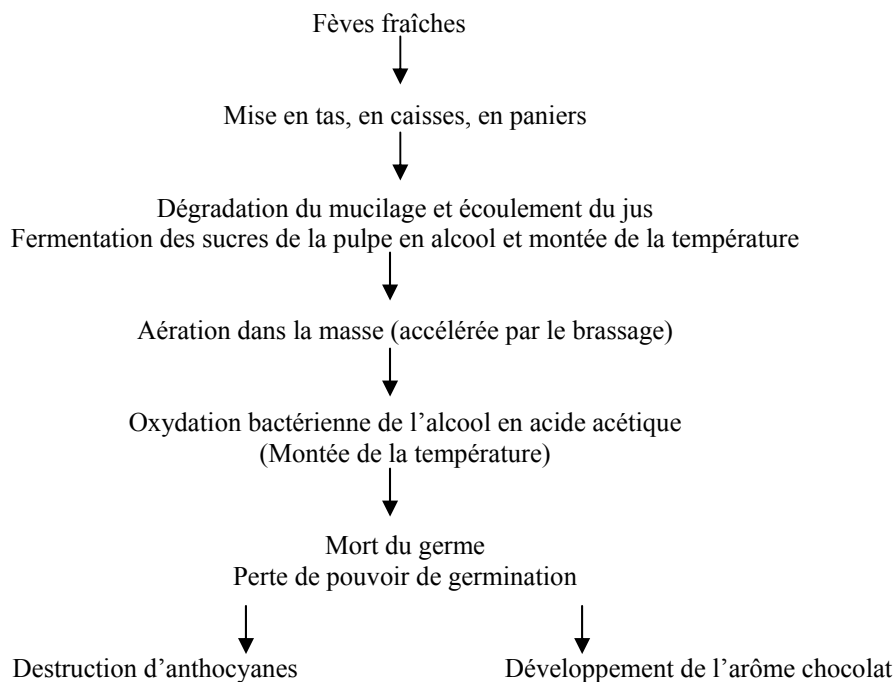


Figure 8: Diagramme simplifié de la fermentation du cacao

1- 6- 3- 1- Etapes de la fermentation

C'est une opération complexe, qui se déroule en deux phases:

Phase anaérobie

En l'absence de l'air, la pulpe sucrée et le pH bas (3 à 3,5) constituent un milieu favorable au développement des levures. Celles-ci transforment les sucres en alcool éthylique avec un dégagement de gaz carbonique et une élévation très importante de la température (jusqu'à 35-40°C après 48 h) (Mossu, 1990).

Outre la transformation des sucres en éthanol, l'activité des levures induit la disparition de l'acide citrique présent dans la pulpe et le pH augmente jusqu'à la valeur de 4. Les enzymes pectinolytiques détruisent la pulpe et provoquent l'écoulement du jus (Pontillon, 1997).

Phase aérobie

La transformation des sucres en éthanol, la montée du pH au voisinage de 4, et la désagrégation de la pulpe qui permet la pénétration de petites quantités d'air, créent de nouvelles conditions favorables aux bactéries acétiques. Elles transforment par oxydation, l'alcool éthylique en acide acétique. Il s'ensuit la mort de l'embryon et des lyses des parois cellulaires dans les cotylédons rendant possible les échanges inter-cellulaires. Les protéines sont hydrolysées, les polyosides donnent des sucres réducteurs (glucose et fructose), certains polyphénols s'oxydent en quinone et se combinent aux protéines (Villeneuve *et al.*, 1989). La matière grasse, quant à elle, ne subit pas de transformation notable (Rohan, 1961).

1- 6- 3- 2- Microflore de la fermentation

La microflore rencontrée lors de la fermentation du cacao est multiple et variée. Les levures sont les premières à coloniser le milieu, suivi des bactéries lactiques, auxquelles succèdent les bactéries acétiques que remplacent au final les bacilles sporulés aérobies (Lehrian, 1984 ; Lagunes Gálvez *et al.*, 2005 ; Camus *et al.*, 2007 ; Nielsen *et al.*, 2007). Il est à noter que c'est la succession de ces microflores, en fonction d'une aération suffisante (bonne fréquence de brassage), qui conduit à un bon profil de variation de la température et du pH.

Comme il est dit plus haut, les levures proviennent de la contamination naturelle pendant l'écabossage. Elles se multiplient abondamment pendant l'anaérobiose et occasionnent une élévation du pH due à la consommation de l'acide citrique. La réaction est très exothermique. Les levures les plus fréquemment rencontrées lors de la fermentation naturelle du cacao

appartiennent aux genres *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Candida* et *Kloeckera* (Ciferri, 1931 ; Gauthier *et al.*, 1977 ; Carr, 1979 ; Daguenet *et al.*, 1980 ; Carr, 1982 ; Ravelomanana *et al.*, 1984 ; Ardhana et Fleet 2003 ; Schawn, 2004 ; Jespersen *et al.*, 2005). Nielsen *et al.* (2007) relèvent une forte prolifération d'*Hanseniaspora guilliermondii* durant les 24 premières heures de la fermentation en tas du cacao. Après 36 à 48 h de fermentation, *S. cerevisiae* et *Pichia membranifaciens* deviennent les plus abondantes dans toutes les fermentations. Seule *P. membranifaciens* sera retrouvée en fin de fermentation (Jespersen *et al.*, 2005). *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida zemplinina* (Nielsen *et al.*, 2005) et *Hanseniaspora* (Lagunes Gálvez *et al.*, 2005) sont nouvellement décrites, respectivement dans les fermentations sur plateaux au Ghana et en caisse en République Dominicaine.

Les bactéries lactiques sont présentes dans le matériel végétal et leur développement débute lorsque les conditions sont favorables : microaérophilie, pH et température adéquats, substrat disponible. Ces bactéries produisent de l'acide lactique qui provoque l'abaissement du pH dans les cotylédons. La fermentation lactique n'est pas souhaitable pour obtenir un cacao de qualité car l'acide lactique produit pénètre à l'intérieur des cotylédons et y reste définitivement à cause de sa très faible volatilité. Le genre *Lactobacillus* est le plus rencontré. Au Ghana, les espèces les plus fréquentes sont *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc pseudoficulneum*, *Pediococcus acidilactici* et *Enterococcus casseliflavus* (Camus *et al.*, 2007 ; Nielsen *et al.*, 2007). Au Brésil et au Belize, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Lactococcus* sont les genres les plus répandus (Passos *et al.*, 1984 ; Thompson *et al.*, 2001).

Les bactéries acétiques transforment par oxydation exothermique l'éthanol en acide acétique (Lagunes-Gálvez, 2002). Le genre *Acetobacter* est le plus rencontré et les espèces trouvées varient en fonction des pays. Au Ghana, les espèces *A. pasteurianus*, *A. tropicalis* *A. syzygii*, sont les plus répandues (Camus *et al.*, 2007 ; Nielsen *et al.*, 2007) tandis qu'au Brésil ce sont plutôt les espèces *A. liquefaciens*, *A. pasteurianus* et *A. peroxydans* (Roelofsen, 1953 ; Ostovar et Keeny, 1973 ; Carr, 1982 ; Ardhana, 2003 ; Schawn, 2004 ; Nielsen, 2007).

Les bactéries sporulées se développent lorsque la fermentation est prolongée. Elles produisent un certain nombre de molécules, acides gras et alcools, qui influencent beaucoup l'arôme final du cacao. C'est le cas de *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. coagulans*,

B. licheniformis. D'autres genres non sporulés, comme *Micrococcus*, *Propionibacterium* et *Zymomonas* (Freitas-Schawn, 1986 ; Nielsen *et al.*, 2007), sont parfois présents.

1- 6- 3- 3- Différentes méthodes de fermentation

Plusieurs méthodes sont utilisées pour fermenter le cacao. Les graines sont mises en tas, en caisses (méthode recommandée), voire même dans des paniers (Bourgeois, 1985).

En tas, les graines sont déposées sur un tapis de feuilles de bananiers, elles-mêmes posées sur un lit de branchages qui facilite le drainage du jus. Le tas de fèves est recouvert de feuilles de bananier. Cette méthode est la plus employée au Ghana et est également pratiquée au Nigeria et en Côte d'Ivoire.



En caisse (Figure 9), les graines sont versées dans une caisse en bois ou en plastique munie de trous de drainage à la base pour faciliter l'écoulement du jus. Le volume du bac est très variable et doit être adapté aux possibilités de récolte. Une caisse de 50 x 50 x 50 cm convient pour 80 kg de fèves. Lorsque la caisse est remplie, la masse est recouverte des feuilles de bananier afin de favoriser l'ensemencement naturel des levures et bactéries. Le brassage se fait par transvasement de la masse d'un bac à l'autre (Braudeau, 1969 ; Mossu, 1990)

Figure 9 : Mise en fermentation des fèves.

La fermentation en panier est beaucoup plus employée au Nigeria. Les paniers, tressés en fibres végétales, peuvent être de toutes dimensions. Les paniers remplis sont posés sur le sol et recouverts des feuilles de bananier. Le brassage se fait en transvasant d'un panier à un autre (Mossu, 1990).

1- 6- 4- Séchage

Le séchage a pour but de diminuer l'humidité des grains de 25 % à moins de 8 % afin d'assurer une bonne stabilité du produit pendant le stockage et le transport (Sandoval, 2002). Il a pour but d'arrêter les processus fermentaires par la neutralisation des réactions chimiques à l'intérieur de la graine (Cros, 1995). La température de séchage doit être inférieure à 60°C. Deux méthodes couramment utilisées sont le séchage solaire ou naturel et le séchage artificiel.

1- 6- 4-1- Séchage naturel



Figure 10 : Séchage solaire

C'est le mode de séchage le plus simple et le plus répandu au monde quand les conditions le permettent, c'est-à-dire quand la période de récolte coïncide avec la saison sèche. C'est le cas de l'Afrique et des Antilles. Les graines fermentées sont étalées en couche mince (3 à 4 cm) au soleil (Figure 10). La durée de séchage est généralement de huit à quinze jours selon les conditions climatiques. Le séchage solaire peut se faire sur une aire de séchage cimentée, sur natte, sur bâche ou sur claie mobile (« autobus »).

Le séchage sur natte ou sur bâche est beaucoup plus utilisé dans des petites exploitations où la récolte est moins importante. Il est préférable d'allier les deux méthodes c'est-à-dire étaler le cacao sur une natte, elle-même posée sur une bâche en plastique noir. La chaleur absorbée par le plastique permet d'obtenir un bon séchage après quelques jours.



Figure 11 : Séchoir de type « autobus »

Les séchoirs à toit mobile et à toit fixe « autobus » (Figure 11) où plusieurs étages peuvent être superposés, sont utilisés dans des exploitations industrielles. Il s'agit d'abris avec un toit mobile ou fixe, en bois couvert de nattes ou de tôles, avec des plateaux montés sur rails. Cette méthode de séchage est très rencontrée aux Antilles et en République Dominicaine.

1- 6- 4- 2- Séchage artificiel

Le séchage artificiel est utilisé lorsque les conditions climatiques ne sont pas favorables (régions humides ou à faible ensoleillement). Il peut également être utilisé lorsque l'importance de la récolte nécessite l'utilisation des surfaces considérables. Ce type de séchage présente des avantages multiples, tels une économie de temps, d'espace et de main d'œuvre et une homogénéité du produit final obtenu. Néanmoins, si le séchage est trop rapide, le phénomène de croûtage précoce peut empêcher les réactions d'oxydation et l'acide acétique reste emprisonné dans les cotylédons, développant ainsi un excès d'acidité (Jacquet *et al.*, 1980). L'inconvénient de la méthode réside également au niveau du coût des équipements et du fonctionnement.

Plusieurs types de séchoir sont utilisés. Les séchoirs simples sont des fours où le cacao est séché par l'air chaud sur une plateforme. De fabrication facile, le séchoir « Samoa » est le plus utilisé, en exploitation familiale comme en grande plantation, avec du bois ou du fuel comme combustible (Figure 12). Il se compose d'un conduit d'aspiration aménagé dans une chambre de répartition d'air et d'une plateforme de séchage perméable située au-dessus. La longueur est limitée à 6 m pour assurer l'homogénéité du séchage. Le séchoir a une capacité de 225 à 275 kg de fèves par fournée. Le temps de séchage varie entre 36 et 48 heures. Les séchoirs mécaniques sont des séchoirs rotatifs où l'air chaud circule entre les fèves contenues dans un cylindre en mouvement. La vitesse du tambour doit être lente, d'environ 0,25 à 0,5 t/min afin d'éviter la rupture des graines (Bopajah, 1991 ; Cros, 1995 ; De Brito, 2000). Les séchoirs rotatifs sont rentables pour des volumes importants de cacao. Il peut être utilisé au cours des dernières étapes du séchage lorsque les fèves sont séchées extérieurement.

Les séchoirs à plateforme comprennent une plateforme de séchage, un radiateur à air chaud et une gaine. La plateforme de séchage est longue et étroite afin d'assurer la distribution uniforme de l'air chaud et faciliter le brassage des fèves. La plateforme est connectée au radiateur d'un débit de $70 \text{ m}^3 / \text{min}$. La température de l'air est de 50°C supérieure à la température ambiante et permet d'obtenir une tonne de fèves sèches en 32 à 34 heures.



Figure 12 : Séchoir artificiel de type « Samoa »

A l'issue de ce traitement, les graines ou fèves de cacao sont conditionnées et le plus souvent exportées vers les pays transformateurs.

1- 7- Cas spécifique du Cameroun

Le Cameroun est classé 5^{ème} pays producteur mondial de cacao. Sa production annuelle est estimée à 195 000 tonnes de cacao marchand pour près de 400 000 planteurs sur 400 000 ha. Ce qui représente 5 % de la production mondiale, derrière la Côte d'Ivoire (38 %), le Ghana (19 %), l'Indonésie (13 %), le Nigeria et le Brésil (5 % également) (Figure 13).

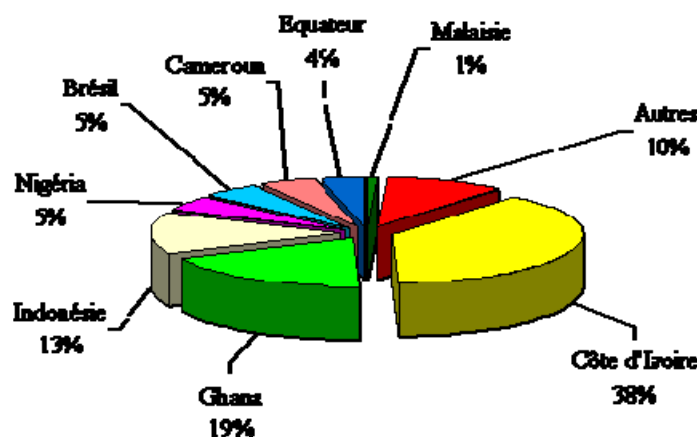


Figure 13 : Principaux pays producteurs de fèves de cacao en 2008 (Source : ICCO, bulletin trimestriel de statistiques du cacao vol :XXXIV 2007/2008)

La récolte se fait deux fois par an : une grande campagne qui dure 4 mois (septembre à décembre) et une campagne intermédiaire qui dure environ 2 mois (mars-avril).

Le type de cacaoyers le plus fréquent est le « Haut amazonien » suivi du type Trinitario. La production cacaoyère au Cameroun se répartit dans trois grands bassins (Figure 14).

Le bassin du Sud-Ouest, qui est le plus important bassin de production, représente 50 % de la production nationale. Le rendement est de 500-600 kg/ha. La principale ville est Kumba qui est située à 400 km de Yaoundé, la capitale. La production est étalée sur toute l'année avec un pic située entre Septembre et Décembre. La pluviosité est unimodale, avec des précipitations pouvant atteindre en moyenne 3000 mm par an. Cette pluviosité implique une humidité importante (~90 %), ce qui favorise une prolifération de nombreux microorganismes qui peuvent influencer la qualité finale du cacao venant de cette région : d'où le choix de ce bassin comme site pour cette étude.

La fermentation se fait dans des grands bacs et dure 6 à 7 jours sans brassage. Compte tenu du fait qu'il pleut toute l'année, seul le séchage artificiel est pratiqué. Les séchoirs rencontrés sont du type « Samoa » et le séchoir traditionnel horizontal. L'Union Européenne, dans le cadre d'un projet sur le goût de "fumé" du cacao, commence à introduire auprès des planteurs des séchoirs améliorés.

Le bassin du Centre-Sud est un verger ancien avec une production en perpétuelle décroissance (rendement < 200 kg/ha). Les principales zones de production sont Ebolowa, Sangmelima et Bertoua qui sont respectivement situées à 165, 175 et 350 km de Yaoundé. La production

s'étend de Septembre à Décembre. La pluviosité est bimodale avec des précipitations annuelles d'environ 1700 mm et une humidité relative de 80 %.

Les troncs de bananier sont assemblés de sorte à constituer un bac qui est utilisé pour la fermentation. La fermentation dure 3 à 4 jours avec un brassage manuel au bout de 48 heures. Seul le séchage solaire est pratiqué car la période de récolte coïncide avec la saison sèche. Les fèves fermentées sont séchées soit sur l'asphalte (goudron), les nattes ou sur les claies mobiles de type « autobus ».

Le bassin de Centre-Nord est un verger nouveau. La principale zone de production est située autour de la ville de Bafia, située à 120 km de Yaoundé. La pluviosité est également bimodale et les précipitations peuvent atteindre 1450 mm par an et une humidité relative de 70 %.

La fermentation se fait en tas et dure 4 jours avec un brassage au bout de 48 h. Comme dans le bassin de Bertoua, seul le séchage solaire est pratiqué. Le séchage se fait sur les aires de séchage cimenté, sur l'asphalte ou sur les nattes (Wood et Lass, 1985 ; MINADER/DESA, 2008).

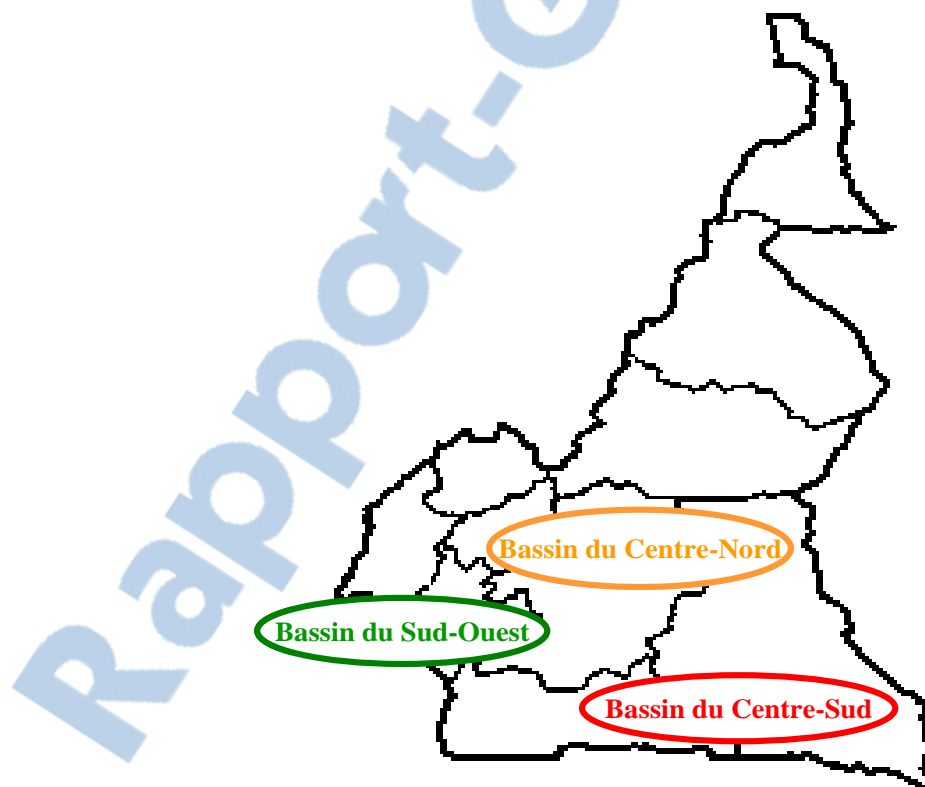


Figure 14 : Les grands bassins de production cacaoyère au Cameroun

2- MYCOTOXINES ET MYCOTOXINOGENESE

2- 1- Mycotoxines

Les mycotoxines sont des substances toxiques issues du métabolisme secondaire de certaines espèces fongiques. Elles peuvent également être définies comme des métabolites produits après l'arrêt de la réduction des groupes cétoniques pendant la biosynthèse des acides gras chez les moisissures (Gimeno, 2000). Elles ont des effets toxiques sur l'organisme humain et animal (Eskola, 2002). La toxicité peut être aiguë, chronique, mutagénique ou tératogénique. Les métabolites secondaires sont pour la plupart élaborés par famille de produits chimiquement voisins ; ceci s'explique par l'existence des « grilles métaboliques » (Bu'Lock et Jaquet, 1965). Certaines voies métaboliques servent ainsi d'exutoires permettant au micro-organisme de ne pas accumuler des métabolites primaires potentiellement toxiques pour lui.

La présence inévitable des mycotoxines dans la nature fait qu'il est particulièrement difficile de garantir l'innocuité des aliments. Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), au moins 25 % des cultures vivrières dans le monde sont contaminées par des mycotoxines. Les plus touchés sont le raisin et ses dérivés, les céréales et leurs dérivés, le cacao, le café, les arachides. Le volume mondial de produits à risque est estimé à 100 millions de tonnes, dont plus de 20 millions dans les pays en voie de développement (Park et Boutrif, 1999).

Les mycotoxines sont souvent classées en fonction des espèces fongiques qui les produisent et des produits qu'elles contaminent. De nos jours, environ 300 mycotoxines différentes ont été isolées et caractérisées. Les plus communes dans les aliments et les plus importantes au niveau sanitaire et économique sont : aflatoxines, ochratoxines, trichothécènes, zéaralénone, fumonisines, alcaloïdes de l'ergot, citrinine, patuline, stérigmatocystine (Gimeno, 2000).

Les principales mycotoxines, les espèces productrices et les denrées associées sont représentées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Espèces fongiques toxigènes contaminantes des denrées alimentaires et mycotoxines associées

Mycotoxines	Principales espèces fongiques	Principales denrées alimentaires contaminées
Aflatoxines	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	Arachides, céréales, fruits, fruits secs, lait
Trichothécènes	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>	Céréales, légumineuses
Alcaloïde de l'ergot	<i>Claviceps purpurea</i>	Céréales
Acide cyclopiazonique	<i>A. flavus</i> , <i>Penicillium cyclopium</i>	Céréales
Citrinine	<i>P. citrinum</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. citreoviride</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>Monascus purpureus</i>	Céréales et fruits
Deoxynivalénol	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. sporotrichioides</i>	Céréales
Ochratoxine A	<i>A. ochraceus</i> , <i>P. nordicum</i> , <i>P. verrucosum</i> (<i>viridicatum</i>), <i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. alliaceus</i> , <i>A. terreus</i>	Vin, raisin, café, cacao, céréales...
Stérigmatocystine	<i>A. versicolor</i> , <i>A. nidulans</i>	Céréales
Fumonisines	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>	Céréales (maïs)
Patuline	<i>A. clavatus</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. granulatum</i> , <i>Byssosclamyces nivea</i> , <i>Paecilomyces varioti</i>	Céréales et fruits
Zéaralénone	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. semitectum</i>	Céréales

Sources : Li *et al.*, 1997, Engelhardt *et al.*, 1999, Gimeno 2000, Pascale *et al.*, 2000, Peraica 2000, Delage *et al.*, 2003, Büniger *et al.*, 2004, Kaniou-Grigoriadou *et al.*, 2005, Hymery *et al.*, 2006

2- 2- Mycotoxinogénèse

Les voies de biosynthèse des mycotoxines ne sont pas toutes bien élucidées. La méthode moléculaire est une méthode d'avenir pour leur étude (Taylor *et al.*, 1999). Le séquençage de l'ADN a permis la préparation d'amorces ou de sondes spécifiques des espèces productrices (Edwards *et al.*, 2002). La PCR, ainsi que la technique RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) ont été utilisées pour l'identification des gènes impliqués dans la biosynthèse des mycotoxines (Morin *et al.*, 1999 ; Lopes *et al.*, 2000).

Les moisissures productrices de mycotoxines sont capables de se développer sur plusieurs substrats et dans différentes conditions d'humidité, de pH et de température. Cependant, elles ne colonisent que les tissus morts des plantes lorsque la culture a été infectée par des organismes pathogènes ou abîmés (Zimmerli et Dick, 1996). Ces moisissures peuvent se développer pendant la culture, le séchage (saprophytes) ou pendant le transport et le stockage (endophytes) des produits agricoles. De plus, certaines moisissures sont capables de synthétiser plusieurs mycotoxines (Eskola, 2002).

Trois types de facteurs conduisent à la colonisation fongique et à l'imprégnation mycotoxique d'une denrée : il s'agit des facteurs physiques, chimiques et biologiques (D'Mello *et al.*, 1997).

2- 2- 1- Facteurs physiques

Activité de l'eau (A_w)

La toxinogénèse dépend fortement de l'activité en eau (A_w). Quand les autres facteurs ne sont pas limitants, la toxinogénèse croît d'une façon exponentielle avec l' A_w jusqu'à un maximum où on observe un ralentissement de la toxinogénèse due à un défaut d'oxygénation (Sùarez-Quiroz *et al.*, 2004).

Les conditions optimales de toxinogénèse sont fonction de l'espèce et de la nature du substrat. L' A_w optimale pour *Aspergillus ochraceus* se situe entre 0,95 et 0,99 sur des milieux riches en sucre et 0,81 sur des milieux contenant du NaCl. Elle est de 0,82 chez *A. carbonarius* et est inférieure à 0,80 chez *Penicillium verrucosum* dans les mêmes conditions (Pitt et Hocking, 1997).

Température

La température optimale de toxinogénèse est généralement voisine (légèrement inférieure) de la température optimale de croissance des souches productrices (Samson, 1991).

Aspergillus ochraceus est une espèce mésophile - xérophile. Il se développe entre 8 et 37°C, avec un optimum entre 24 et 37°C. Peu d'informations sont disponibles sur *A. carbonarius* car sa capacité à produire l'OTA n'a été rapportée que récemment. Des études préliminaires récentes indiquent des conditions optimales entre 32 et 35°C (Téren *et al.*, 1996 ; Varga *et al.*, 1996 ; Heenan *et al.*, 1998). *Aspergillus niger* se développe de façon optimale à des températures hautes, avec un optimum entre 35-37°C. *P. verrucosum*, quant à lui, est capable de croître à basse température (entre 0 et 31°C, l'optimum est à 20°C). La patuline, l'acide pénicillique et l'OTA sont élaborés à des températures généralement inférieures à celles de la croissance. Les températures optimales de croissance et de production d'aflatoxines chez *A. flavus* sont proches (Samson, 1991). Pour d'autres toxines (trichothécène et zéaralénone), la température optimale de toxinogénèse peut être jusqu'à 10°C inférieure à celle de la croissance (Samson, 1991).

2- 2- 2- Facteurs chimiques

Oxygène

La réduction de la pression partielle en oxygène a un effet inhibiteur bien plus important sur la toxinogénèse que sur la croissance du champignon. La production d'aflatoxine est fortement inhibée lorsque la concentration en oxygène est inférieure à 1 % (D'Mello et MacDonald, 1997).

Traitements agricoles

L'utilisation des produits phytosanitaires sur les plantes pendant les traitements agricoles a une action préventive sur l'apparition des mycotoxines. L'emploi des pesticides protège des lésions dues aux insectes et acariens et réduit la contamination par les souches toxinogènes ou la production des mycotoxines (Blateyron *et al.*, 2001 ; Molot, 2003).

Nature du substrat

La toxinogénèse est plus étroitement liée à la composition chimique de la denrée que la croissance fongique. La biosynthèse de certaines mycotoxines peut être favorisée par la

présence des glucides dans le substrat, puis des lipides et enfin les protéines qui ont une moindre influence (Pitt et Hocking, 1997).

2- 2- 3- Facteurs biologiques

Les facteurs biologiques sont liés à l'espèce fongique, à la spécificité et la variation de la souche et à l'instabilité des propriétés toxiques. Une même toxine peut être élaborée par différentes espèces qui peuvent être de genres différents. C'est notamment le cas de la patuline et de l'OTA qui sont produites par plusieurs espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*. Une même espèce peut également produire plusieurs toxines (production d'OTA et de citrinine par *Penicillium verrucosum* ; d'OTA et d'acide pénicillique par *Aspergillus ochraceus* ; de citrinine et de patuline par *Penicillium claviforme* ou *Aspergillus terreus*) (Le-Bars, 1988). Au sein d'une espèce réputée toxigène, toutes les souches peuvent ne pas avoir cette propriété. La fréquence de souches toxigènes dépend de l'espèce fongique. Pour une même espèce, la production des toxines peut dépendre de la région et du substrat d'origine (Kokkomen *et al.*, 2005).

A côté de tous ces facteurs qui sont généraux aux mycotoxines, il faut relever que chaque souche toxigène a une physiologie différente et par conséquent un habitat écologique différent.

3- OCHRATOXINE A

3- 1- Structure chimique et propriétés physico-chimiques

L'Ochratoxine A ($C_{20}H_{18}ClNO_6$) [7-(L-β-phénylalaninyl-carboxyl)-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3R-méthylisocoumarine] est une isocoumarine liée par un groupement carboxy à une L-β-phénylalanine. La Figure 15 montre la structure chimique de l'OTA (Ringot *et al.*, 2006).

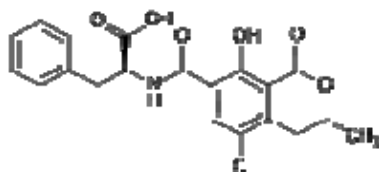


Figure 15 : Structure de l'Ochratoxine A

C'est un solide blanc de masse molaire 403,8 g/mole, ayant un point de fusion de 90°C lorsqu'elle est cristallisée dans le xylène. Le spectre d'absorption UV de l'OTA 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 5 500 mol/cm dans l'éthanol. Elle a un maximum d'émission de fluorescence à 467 nm dans l'éthanol à 96 % et à 428 nm dans l'éthanol absolu (Steyn, 1993 ; Scott, 1994 ; Jiménez *et al.*, 1999 ; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1999).

L'OTA est un acide faible. Elle est soluble dans les solvants organiques polaires et dans des solutions aqueuses de bicarbonate sodique. Elle est partiellement soluble dans l'eau. Sous forme de sel sodique, l'OTA est soluble dans l'eau (OMS, 1990). Le pK_a du groupe de la phénylalanine est de 4,8, et celui du phénol 7,1 (Dall'Asta *et al.*, 2004).

Généralement, l'OTA est stable et peut être conservée au réfrigérateur sous forme dissoute dans l'éthanol ou du méthanol. Plusieurs études montrent sa stabilité vis-à-vis de la température et des radiations γ quand elle est en solution dans du méthanol (Scott, 1994 ; Valenta, 1998). Pour être complètement hydrolysée, l'OTA doit subir un chauffage sous reflux pendant 48h en présence de l'HCl 6M (Stander *et al.*, 2000 a) ou subir des traitements enzymatiques (Scott, 1994).

Composés dérivés de l'OTA

L'OTA présente plusieurs analogues qui peuvent être naturels ou synthétiques. Les analogues naturels sont constitués de l'Ochratoxine B (OTB) qui est le dérivé non chloré de l'OTA, l'Ochratoxine C (OTC) qui est l'ester éthylique de l'OTA, et l'Ochratoxine α qui est le dérivé isocoumarine obtenu après l'hydrolyse de la liaison peptidique avec élimination de la phénylalanine (Harris et Mantle, 2001). Avec l'OTA, l'OTC est la plus toxique tandis que l'OTB et l'OT α sont peu toxiques. Toutefois si l'OT α est très concentrée, elle peut provoquer un échange des chromatides sœurs (Follmann *et al.*, 1995 ; Xiao *et al.*, 1996).

Les analogues synthétiques de l'OTA sont constitués de l'épimère d'OTA (d-OTA), l'éthylamide d'OTA (OE-OTA), l'OTA décarboxylée (DC-OTA), l'OTA o-méthylée (OM-OTA), et le méthylester d'OT α (M-OT α) (Xiao *et al.*, 1996).

3- 2- Toxicologie de l'OTA

L'OTA agit principalement en inhibant la synthèse des protéines par compétition avec la phénylalanine au niveau de la fixation de cet acide aminé sur son acide ribonucléique de transfert (ARNt) spécifique, catalysée par la phénylalaninyl-ARNt synthétase. De plus, l'OTA et ses métabolites se fixent sur l'adénine et surtout sur la guanine. Il en résulte la formation de trois types d'adduits : les adduits classiques, les adduits exocycliques et les pontages. Ces réactions sont à l'origine de plusieurs toxicités graves.

Néphrotoxicité

L'OTA est responsable de l'apparition d'un nombre drastique de tumeurs dans les voies urinaires supérieures rencontrée dans les Balkans. Cette corrélation est établie par plusieurs études scientifiques (Bordas *et al.*, 1973 ; Chernozemsky *et al.*, 1977; Markovic, 1985). Des études récentes relèvent également un taux élevé de citrinine au sein de cette population. La néphrotoxicité de l'OTA est démontrée chez toutes les espèces testées, à l'exception des ruminants adultes où a été observée une métabolisation de l'OTA.

Tératogénicité

L'OTA peut traverser le placenta et provoquer des anomalies morphologiques variées chez les embryons de rat, souris, hamster, porc et poulet. Les mécanismes de la tératogénicité induite par l'OTA ne sont pas encore clairement définis. Elle semble être liée à une action indirecte

de l'OTA sur la mère, et à un effet direct sur le développement embryonnaire (Pfohl-leszkowicz *et al.*, 1999).

Immunotoxicité

Le système immunitaire semble être plus touché par l'OTA que les autres organes qui lui sont sensibles. L'OTA agit sur l'immunité humorale en induisant la régression des immunoglobulines IgG, IgA et IgM. Elle est également responsable de l'inhibition de la réponse immunitaire transmise par les lymphocytes B et T (immunité cellulaire). Des troubles au niveau de la moelle osseuse ont également été observés chez les animaux à qui l'OTA a été administrée.

Génotoxicité

En fonction de la dose, l'OTA provoque la formation d'adduits à l'ADN (Pfohl-leszkowicz *et al.*, 1991). Hennig *et al.* (1991) ont mis en évidence une activité mutagène importante chez *Salmonella typhimurium* exposée au surnageant d'hépatocytes de rats traités *in vitro* par de l'OTA. Ils ont également observé une induction d'échange de chromatides sœurs dans les lymphocytes humains dans un milieu de culture contenant des hépatocytes et de l'OTA. Dans une culture *in vivo*, des cassures simple-brins sont observées au niveau de l'ADN du rein, du foie et de la rate des rongeurs (Manolova *et al.*, 1990).

3- 3- OTA dans les aliments

L'OTA contamine plusieurs denrées alimentaires. Elle a été retrouvée dans les aliments d'origine végétale comme le cacao, le café, les céréales (surtout le maïs, le blé, l'orge et le seigle), les épices, les fruits secs et le raisin. A cause de sa thermostabilité (Boudra *et al.*, 1995), l'OTA est également présente dans les produits transformés (chocolat, bière, vin, pain, jus de raisin, etc...) (Miraglia et Brera, 2002). Les céréales, le vin et le café sont les aliments les plus incriminés dans l'ingestion de l'OTA par l'homme. Leurs contributions à l'ingestion journalière d'OTA sont respectivement de 50, 13 et 10 % (Figure 16).

L'OTA est également présente dans les aliments d'origine animale. Les produits animaux comme la viande de porc ou de volaille sont des sources indirectes d'OTA chez l'homme (Miraglia et Brera, 2002). Il en est de même de leurs produits transformés (saucisses, jambon, etc...) (Chiavarro *et al.*, 2002 ; Miraglia et Brera, 2002). Chez les ruminants, l'apport de

l'OTA au régime humain est minimal grâce à la mycoflore de leur rumen qui dégrade l'OTA en OT α , un métabolite moins toxique.

Chez l'homme, des recherches d'OTA dans le sérum et le plasma (Grosso *et al.*, 2003), les reins (Petzinger *et al.*, 2000), l'urine (Domijan *et al.*, 2003) et le lait (IARC, 1993) révèlent sa présence. Des cas d'ingestion d'OTA par inhalation dans des champs contaminés ont été décrits (Petzinger *et al.*, 2002). De plus l'OTA a été détectée dans le sang d'ouvriers travaillant sans masques de sécurité dans les entrepôts de café, cacao, épices, et également dans les locaux mal ventilés (Iavicoli *et al.*, 2002).

Le Tableau 2 donne la teneur en OTA dans quelques aliments.

Tableau 2 : Teneur en OTA dans quelques produits alimentaires

Matrice	Origine	Echantillons analysés	Echantillons positifs (%)	Moyenne (µg/kg ou L)
Céréales et produits dérivés				
- Maïs	Europe et Argentine	139	90	0,112
- Seigle	Danemark	422	61	0,651
- Riz	Espagne	77	13	0,775
- Orge	Espagne	52	63	0,198
- blé	Danemark	419	54	0,161
- Pain au blé	Inconnu	162	100	0,271
- Bouillie	Italie	238	8	0,032
- bière	Belgique	62	3	0,033
Vin et raisin				
- Vin rouge	Espagne	28	46	0,088
- Vin rosé	Amérique	5	20	0,015
- Vin blanc	Europe	18	22	0,013
- Raisin	Portugal	11	27	0,168
- Raisin sec	Inconnu	85	79	1,81
Café				
- Café vert	Côte d'Ivoire et Zaïre	4	100	10,9
- Café vert	Brésil	135	29	2,09
- Café torréfié	Allemagne	419	46	0,99
- Café décaféiné	Allemagne	71	37	0,49
- Café soluble	Espagne	9	100	0,500
Viande et produits dérivés				
- Viande de porc	Danemark	83	82	0,09
- Viande de poulet	Danemark	65	55	0,021
- Jambon	Italie	42	83	0,838
- Saucisses	Allemagne	201	48	0,09
	Arabie	3	33	0,357
- Fromage	Saoudite			
- Lait	Norvège	87	13	?

Sources : Burdaspal et Legarda, 1998 ; Jorgensen, 1998 ; Burdaspal et Legarda, 1999 ; Skaug, 1999 ; Scudamore et Patel, 2000 ; Otteneder et Marjerus, 2001 ; Aboul-Enein *et al.*, 2002 ; Beretta *et al.*, 2002 ; Chiavaro *et al.*, 2002 ; Jorgensen et Jacobsen, 2002 ; Miraglia et Brera, 2002 ; Lopez de Cerain *et al.*, 2002, Tangni *et al.*, 2002 ; Araguàs *et al.*, 2003 ; Romani *et al.*, 2003 ; Taniwaki *et al.*, 2003 ; Lombaert *et al.*, 2004 ; Rosa *et al.*, 2004 ; Serra *et al.*, 2004 ; González *et al.*, 2006.

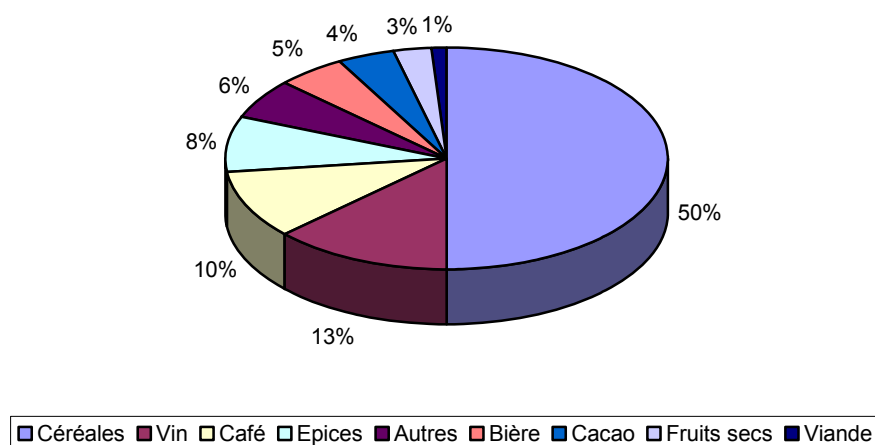


Figure 16 : Contribution des différents aliments à l'ingestion de l'OTA en Europe

3- 4- OTA ET CACAO

3- 4- 1- Occurrence de l'OTA dans le cacao et produits dérivés

3- 4- 1- 1- Fèves et coques des fèves de cacao

Le niveau de contamination des fèves de cacao par l'OTA est variable. Cette contamination est indépendante de l'origine des fèves (Tableau 3).

Tableau 3 : Occurrence de l'OTA dans le cacao provenant de plusieurs pays producteurs.

Origine	Echantillons positifs/ échantillons totaux	Teneur en OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Afrique (Côte d'Ivoire Cameroun, Guinée, Nigeria, Sénégal)	16/21	0,1 – 3,5
Côte d'Ivoire	24/33	0,04 ^a – 14,8
Afrique de l'Ouest	16/21	0,1 – 3,5
Cameroun	3/7	0,04 ^a – 3,88
Guinée Equatoriale	29/46	0,04 ^a – 0,42
Ghana	0/15	<0,1 ^a
Inconnu 1	46/75	>0,04 ^a
Inconnu 2	4/20	100 - 500
Inconnu 3	3/19	100

^a : limite de détection

Sources : Amézqueta *et al.*, 2004 ; Bonvehi, 2004 ; Krogh, 1987.

Une étude portant sur 170 échantillons de diverses origines géographiques a montré que la contamination des fèves de cacao par l'OTA est principalement localisée au niveau des coques (Bonvehi, 2004). C'est ainsi qu'une réduction de 50-100 % est observée avec le décorticage. En décortiquant manuellement, Amézqueta *et al.* (2005) obtient des taux de

réduction variable : > 95 % sur un premier lot d'échantillons, 65-90 % de réduction sur un 2^{ème} lot et 50 % de réduction sur un dernier lot.

3- 4- 1- 2- Produits à base de cacao

Très peu d'études publiées existent sur l'influence des traitements technologiques sur la dégradation ou l'élimination de l'OTA (Burdaspal et Legarda, 2003). Néanmoins, il semblerait que la transformation du cacao ait un effet positif sur la diminution de la teneur en OTA. Lors de la torréfaction, le courant d'air chaud qui traverse la masse de fèves produit deux réactions compétitives : la réaction de Maillard qui génère des composés responsables de l'arôme de cacao, et la désamination oxydative des acides aminés qui libère l'ammoniac. Cet ammoniac contribue à la destruction ou au masquage de l'OTA dans le cacao (Serra Bonvehi, 2004).

Généralement, les produits à base de cacao sont faiblement contaminés par l'OTA. Cette thèse est confirmée par les études menées par CAOBISCO/ECA/FCC en 1999 sur le marché européen. Selon cette étude, la teneur moyenne en OTA est de 0,16 µg/kg dans 228 échantillons de chocolat au lait, 0,26 µg/kg dans 526 échantillons de chocolat noir, 0,20 µg/kg dans 247 échantillons de boisson à base de cacao, et 1,0 µg/kg dans 1189 échantillons de poudre de cacao (Gilmour et Lindblom, 2006). Des résultats similaires sont obtenus en Espagne et dans 13 autres pays européens, ainsi qu'en Argentine et au Japon (Tableau 4).

Tableau 4 : Teneur moyenne en OTA dans le chocolat et les produits à base de cacao en Espagne et dans 15 autres pays

Produits à base de cacao	Teneur moyenne en Espagne	Teneur moyenne dans 15 autres pays
Chocolat au lait	0,116 pg/kg	0,100 pg/kg
Chocolat blanc	0,030 pg/kg	0,027 µg/kg
Chocolat noir	0,246 pg/kg	0,268 µg/kg
Poudre de cacao	0,242 µg/kg	0,168 pg/kg

Sources : Bankole et Adebajo, 2003 ; Boudra *et al.*, 1995 ; ICCO, 2008 ; Murphy *et al.*, 2006 ; Ratters et Matissek, 2000.

3- 4- 2- Estimation de la consommation de l'OTA à partir du cacao

Les données disponibles dans la littérature indiquent que le cacao représente 5 % de l'ingestion totale de l'OTA contre 55 % apporté par les céréales (Miraglia et Brera, 2002). Dans le même sens, la Direction des Aliments et de l'Hygiène Environnementale de Hong Kong (FEHD report, 2006) a fait des études sur 8 grands groupes d'aliments incluant le

chocolat et les produits à base de cacao en février 2006. Sur 287 échantillons d'aliments testés à l'OTA, l'exposition à l'OTA est respectivement de 4 et 9 ng/kg poids corporel/semaine pour un élève moyen du secondaire et un consommateur moyen quelconque.

En France, une étude conduite par Leblanc (2004) indique une moyenne de consommation de chocolat de 5,5 g/j chez les enfants de 3 à 14 ans et 2,7 g/j chez les adultes de 15 ans et plus ; soit une exposition à l'OTA de 0,049 ng/kg p.c./j et 0,011 ng/kg p.c./j respectivement. Le chocolat et les produits à base de cacao constituent seulement 5 % de l'exposition nationale (CAOBISCO/ECA/FCC, 2003).

3- 5- Législation sur l'OTA

Des enquêtes sur la fréquence et les niveaux de présence de l'OTA dans des échantillons de denrées alimentaires et du sang humain indiquent une forte contamination, d'où l'intérêt d'une législation dans le but de protéger le consommateur.

Avant la commission de régulation 188/2007 de l'Union Européenne, seulement 11 pays européens avaient défini des limites maximales de contamination de divers aliments par l'OTA (Boorman, 1989 ; WHO, 1996 ; SCF, 1998 ; Van Egmond, 1999 ; FEHD report, 2006). Dès lors, beaucoup de progrès ont été faits dans le domaine de la sensibilisation. Les principes de base de la législation communautaire concernant les contaminants dans les aliments sont fixés par le règlement de la Communauté Economique Européenne (CEE) n° 315/93 du conseil du 8 février 1993. Le comité scientifique de l'alimentation humaine estime qu'il serait prudent de réduire au minimum l'exposition à l'OTA. L'exposition doit se situer dans la partie basse de la fourchette des doses journalières tolérables de 1,2 à 14 ng/kg p.c./jour, c'est à dire qu'elle soit inférieure à 5 ng/kg de poids corporel/ jour (DGXXIV : SCF, 1995 ; FAO/WHO, 2001 : Règlement CE n° 123/2005).

Le Règlement CE 123/2005 de la commission du 26 janvier 2005 a fixé des limites maximales d'OTA dans certains aliments (Tableau 5)

Tableau 5 : Normes établies sur certaines denrées alimentaires

Aliment	Spécification	Limite maximale admise ($\mu\text{g/kg}$)
Céréales	Céréales en grain brut	5,0
	Produits dérivés ou transformés des céréales	3,0
Raisin	Raisins secs	10,0
	Vins et boissons à base de vin ou de moût de raisin	2,0
	Jus de raisin et boissons à base de jus de raisin	2,0
Café	Café torréfié et café torréfié et moulu	5,0
	Café soluble	10,0
Aliments pour enfants	Aliments élaboré à base de céréale	0,5
	Aliments diététiques	0,5

Actuellement, des normes sur les fèves de cacao, les céréales, la bière, le café vert, les fruits secs sont en cours d'élaboration dans l'Union Européenne. Ces normes pourraient être de $2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pour les fèves de cacao, $4 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pour le nibs (fèves de cacao décortiquée), gâteau de cacao et poudre de cacao, et de $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pour les produits à base de cacao (chocolat à croquer, boisson de chocolat), $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pour le café soluble, $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pour le café torréfié, $4 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pour les céréales et $0,2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pour la bière.

4- MOISSURES PRODUCTRICES DE L'OCHRATOXINE A

4- 1- Généralités sur les moisissures

Les moisissures sont des champignons microscopiques, filamenteux, du règne des mycètes. Les moisissures sont des eucaryotes, hétérotrophes et saprophytes. Elles sont aérobies, et sont en général acidophiles. Par rapport aux autres micro-organismes, les moisissures ont en général un besoin en eau faible et peuvent se développer sur des aliments à faible A_w (jusqu'à 0,65) (Guiraud, 1998). Elles sont dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytique, pectinolytique, amylolytique, protéolytique, lipolytique...) qui en font des agents de dégradation importants. Elles peuvent également être utiles (affinage des fromages, production d'enzymes). Le métabolisme fermentaire des moisissures est soit aérobique avec production d'acides organiques (acides citriques, gluconique oxalique...), soit sémi-aérobique (fermentation lactique ou alcoolique). Certaines moisissures sont capables de produire des métabolites secondaires.

Les moisissures sont identifiables par des techniques classiques d'observation culturales, morphologiques, microscopiques et de la sexualité.

Les caractères cultureux sont essentiellement étudiés sur un milieu solide coulé en boîte de Pétri et ensemencé par touche. Plusieurs milieux de culture plus ou moins sélectifs ont été développés afin de pouvoir différencier les espèces : milieux PDA, DG18, MEA-B, CYA, CREA, Czapek... (Samson *et al.*, 2004). Les caractères étudiés sont la vitesse de croissance, la couleur des colonies (endroit et envers), la couleur du milieu, la texture et l'aspect de la surface, et éventuellement la présence de gouttes de « transpiration » sur le mycélium aérien et l'odeur.

L'examen microscopique permet d'étudier la présence et le type des spores sexuelles (zygospore, basidiospore...), des spores asexuées (conidiophore, conidiogénèse...), les hyphes cloisonnés ou non, le mycélium diffus, épais, coloré ou incolore, la présence des sclérotés... (Guiraud, 1998).

Ces techniques d'identification, basées seulement sur le phénotype, restent incomplètes et très discutées. Pour une classification fiable, il est impératif d'allier le génotype au phénotype.

4- 2- Grands groupes producteurs d'OTA

L'OTA est produite par diverses moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Sa production est essentiellement assurée par 3 grands groupes :

Les *Aspergillus*, sous genre *Circumdati*, section Nigri. C'est un groupe qui renferme un nombre important d'espèces, et dont la classification et l'identification sont très discutées. L'espèce *A. carbonarius* et celles du groupe d'*A. niger* aggregate constituent les principaux producteurs d'OTA. *A. carbonarius* a été décrite comme productrice d'OTA depuis 1996 (Téren *et al.*, 1996). La majorité des isolats (60-100 %) sont producteurs quand ils se développent en culture pure (Battilani *et al.*, 2003 ; Amézqueta *et al.*, 2008). L'intensité de production d'OTA est variable selon les souches (Heenan *et al.*, 1998 ; Taniwaki *et al.*, 1999). *A. niger* a aussi été décrite comme productrice d'OTA (Abarca *et al.*, 1994 ; Heenan *et al.*, 1998 ; Taniwaki *et al.*, 2003) mais sa production est peu commune car seuls 1 à 3 % d'isolats en produisent en culture pure. Récemment (Samson *et al.*, 2007), deux nouvelles espèces de la famille d'*A. niger* agg : *A. laticoffeatus*, *A. sclerotioniger* ont été décrites comme productrices d'OTA.

L'OTA est également produite par un nombre limité d'*Aspergillus*, sous genre *Circumdati*, section *Circumdati* : *A. ochraceus*, *A. sclerotiorum*, *A. melleus* et *A. sulphureus*. La seule d'importance liée à la production d'OTA est *A. ochraceus*. Les autres espèces sont peu connues dans les aliments et ne provoquent pas de détérioration physique (Frisvad et Samson, 2000 ; Bayman *et al.*, 2002).

P. verrucosum est l'unique espèce des *Penicillium* qui a été décrite comme étant productrice d'OTA (Filtenborg *et al.*, 1996). Néanmoins, au moins 27 métabolites toxiques sont reconnus être produits par 32 espèces du genre *Penicillium* (Pitt, 1991).

4- 3- Moisissures productrices de l'OTA dans le cacao

Il existe très peu de travaux sur l'étude des moisissures productrices de l'OTA dans les fèves de cacao. Cependant, Brera *et al.* (2003) et Magan et Aldred (2005) ont suggéré que les responsables pourraient appartenir aux espèces *A. ochraceus*, *A. carbonarius* ou *P. verrucosum*. Aucune souche productrice d'OTA n'a été trouvée parmi les 66 souches isolées pendant la fermentation et le séchage du cacao au Ghana (COCOQUAL, 2006). Au cours d'un screening portant sur 115 souches isolées du cacao d'origine diverse (Côte d'Ivoire,

Nigéria et Ghana), seules 2 souches d'*Aspergillus* ochratoxinogènes ont été trouvés (COCOQUAL, 2006). Une étude basée sur 21 produits à base de cacao (nibs, poudre de cacao) a été conduite au Brésil. L'analyse microbiologique a permis d'isoler 123 isolats d'*Aspergillus* toxinogènes. Parmi ces souches, 100 % des *Aspergillus carbonarius* et 100 % des *Aspergillus ochraceus* sont producteurs d'OTA, tandis que seuls 18,2 % des isolats d'*Aspergillus niger* en produisent (Copetti *et al.*, 2006). Dans une étude portant sur 20 échantillons de cacao marchand de diverses origines et stockés en Espagne, les souches ochratoxinogènes isolées sont les *Aspergillus* noirs (3 souches d'*A. carbonarius* et 13 souches d'*A. niger* agg) (Amézqueta *et al.*, 2008). De même, des essais préliminaires ont montré que dans le cacao d'origine camerounaise, seul les *Aspergillus* noirs de la section Nigri peuvent être isolés.

4- 4- *Aspergillus* noirs de la section Nigri

Les *Aspergillus* noirs, section Nigri regroupent des espèces de grande importance en biotechnologie et en mycologie alimentaire et médicale. Ils sont fréquents, abondants et capables de pousser sur divers substrats (Gams *et al.*, 1985) ; ils sont considérés comme des contaminants naturels des aliments moisiss. Certains de ces *Aspergillus* sont utiles en fermentations industrielles car ils sont capables de produire des enzymes hydrolytiques (amylases, lipases), et des acides organiques (acide citrique, acide gluconique) (Kozakiewicz, 1989 ; Bennet et Klich, 1992 ; Varga *et al.*, 1996). Depuis quelques années, ce rôle bénéfique a été contrebalancé avec la découverte des mycotoxines dont l'Ochratoxine A dans plusieurs denrées contaminées comme le café, le cacao, les céréales, le vin...

La section Nigri est l'un des groupes d'*Aspergillus* dont la classification et l'identification des espèces sont mal élucidées. La taxonomie de ces *Aspergillus* noirs a été étudiée par plusieurs auteurs (Raper et Fennell, 1965 ; Murakami, 1976 a et b ; Murakami, 1979 a–d ; Murakami et Noro, 1979 ; Murakami et Yoshida, 1979 a et b ; Murakami *et al.*, 1979 ; Al-Musallam, 1980 ; Kozakiewicz, 1989 ; Kusters-Van *et al.*, 1991 ; Samson, 1992 ; Parenicova *et al.*, 2000 ; Samson *et al.*, 2004 ; Frisvad *et al.*, 2007 ; Geiser *et al.*, 2007 ; Perrone *et al.*, 2007 ; Samson *et al.*, 2007). Ces travaux révèlent une biodiversité importante et les diverses espèces restent difficilement reconnaissables sur les seuls critères phénotypiques en particulier un groupe d'espèces très voisines appelé *Aspergillus niger* aggregate. Seule la combinaison des critères morphologiques et moléculaires permet de les différencier. Les données récentes de la littérature font état de 19 espèces dans la section Nigri (Tableau 6).

Tableau 6 : Caractéristiques des *Aspergillus* noirs

Espèces	Origine	Taille des conidies (mm)	Ornement des conidies	Production d'OTA
Espèces unisériés				
<i>A. aculeatinus</i>	Café arabica vert (Thailand)	2,5-4,5	échinulées	-
<i>A. aculeatus</i>	Inconnu	3,5-5	échinulées	-
<i>A. japonicus</i>	Raisin (Italie)	3,5-5	échinulées	-
<i>A. uvarum</i>	Raisin (Italie)	3-4		-
Espèces bisériés				
<i>A. carbonarius</i>	Air (Indonesie)	7-9	spinulées	+
<i>A. sclerotii carbonarius</i>	Café robusta vert (Thailand)	4,8-9,5	lisses à rugueuses	-
<i>A. heteromorphus</i>	Culture (Brezil)	3,5-5	échinulées	-
<i>A. ellipticus</i>	Sol (Costa Rica)	3,3-5,5	échinulées	-
<i>A. niger aggregate</i>				
<i>A. niger</i>	Café (Kenya)	3,5-5	lisses	+
<i>A. vadensis</i>	Inconnu	3-4	rugueuses à échinulées	-
<i>A. brasiliensis</i>	Sol (Australie)	3,5-4,5	lisses	-
<i>A. costaricaensis</i>	Sol (Costa Rica)	3,1-4,5	lisses à rugueuses	-
<i>A. homomorphus</i>	Israël	5-7	échinulées	-
<i>A. lacticoffeatus</i>	Café (Venezuela)	3,4-4,1	lisses à rugueuses	+
<i>A. sclerotioniger</i>	Café (Inde)	4,5-6,4	lisses à verruqueuses	+
<i>A. tubingensis</i>	Inconnu	3-5	lisses à échinulées	-
<i>A. foetidus</i>	Japon	3,5-4,5	lisses	-
<i>A. ibericus</i>	Raisin (Portugal)	5-7	spinulées	-
<i>A. piperis</i>	Piment (Danemark)	2,8-3,6	lisses à striées	-

Sources : Raper and Fennell, 1965 ; Al-Musallam, 1980 ; Kozakiewicz, 1989 ; Samson *et al.*, 2004 ; Samson *et al.*, 2007

4- 5- Approche génotypique

L'approche moléculaire est de nos jours très utilisée et indispensable dans la détermination des moisissures, notamment celles productrices de l'OTA. Grâce à la PCR, l'étude génotypique de plusieurs souches a été faite. Les principales techniques moléculaires utilisées pour l'étude du polymorphisme des ADN sont la PCR-RFLP, la PCR-AFLP, la RAPD-PCR, le séquençage d'une région cible de l'ADN...

La PCR utilise des amorces plus ou moins spécifiques ciblant des séquences variables selon les objectifs. Elle est basée sur l'utilisation d'une polymérase thermostable qui est la *Taq* polymérase et consiste à amplifier spécifiquement un fragment d'ADN afin de le rendre détectable par électrophorèse.

Le ribotypage utilise des primers spécifiques complémentaires de séquences bien localisées de la région ITS₁/ITS₂ de l'ADN ribosomal. Cette technique permet de différencier certains *Aspergillus* noirs (Haugland et Vesper, 2002 ; Gonzalez-Sagado *et al.*, 2005). S'il est facile d'identifier *A. carbonarius*, il n'est pas aisé de différencier les autres *Aspergillus* noirs, notamment les *A. niger* agg. En effet une quasi-similitude de la partie ciblée de la séquence ITS₂ peut être constatée chez plusieurs espèces (Tableau 7 ; données consultables dans la banque de données NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ; il s'agit de *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis*, *A. foetidus*, *A. lacticoffeatus*, *A. costaricensis*, et *A. vadensis*. Il est à noter que ces espèces sont des *A. niger* agg selon Samson *et al.* (2007). De même, des similitudes de séquences sont obtenues chez les espèces unisériées *A. aculeatus*, *A. japonicus*, *A. uvarum*. Il est ainsi difficile de différencier ces espèces par ce type d'amplifications. Une technique susceptible de les différencier pourrait être le séquençage et la comparaison des fragments amplifiés.

Tableau 7 : Comparaison des séquences partielles ITS₂ de quelques *Aspergillus* noirs

Séquence partielle ITS ₂	Nom	Code NCBI
5' GCCGTCCCC TCTCTCCGG 3'	<i>A. niger</i>	<u>AJ 876876</u>
GCCGTCCCC TCTCTCCGG	<i>A. brasiliensis</i>	Q900598
GCCGTCCCCCTCTC CGGG	<i>A. niger</i>	AY585554, AY585533
GCCGTCCCCCTCTC CGGG	<i>A. tubingensis</i>	<u>AJ 876877</u> , AJ280007
GCCGTCCCCCTCTC CGGG	<i>A. brasiliensis</i>	DQ900601
GCCGTCCCCCTCTC CGGG	<i>A. foetidus</i>	AY585551
GCCGTCCCCCTCTC CGGG	<i>A. lacticoffeatus</i>	DQ900604
GCCGTCCCCCTCTC CGGG	<i>A. costaricensis</i>	DQ900602
GCCGTCCCCCTCTC CGGG	<i>A. vadensis</i>	AY585549
GCCGTCCCCCTTTC CGGG	<i>A. ibericus</i>	AY656627
GCCGTCCCCCATCC CGGG	<i>A. ellipticus</i>	AY585548
GCCGTCCCCCTCTCCGGG	<i>A. piperis</i>	DQ900603
GCCGTCCCCCTGTCTGGG	<i>A. carbonarius</i>	DQ 900605
GAGTCCCCCGGGGGCTG	<i>A. homomorphus</i>	EF66063
GCGCCCCCGGGGGCGG	<i>A. aculeatus</i>	AY585556
GCGCCCCCGGGGGCGG	<i>A. japonicus</i>	AY585560
GCGCCCCCGGGGGCGG	<i>A. uvarum</i>	AM745757
GTCGTCCCCCCCC GGG	<i>A. heteromorphus</i>	AY 585547

Souligné : souches déposées par Salgado-González *et al.* (2005)

Couleur verte : espèces unisériées

Il est aussi possible d'utiliser pour cibles des séquences de gènes spécifiques à un ou plusieurs produits comme celui de la calmoduline (Perrone *et al.*, 2004 ; Susca *et al.*, 2007 ; Varga *et al.*, 2007) ou de la β tubuline (Samson *et al.*, 2004 ; Varga *et al.*, 2007).

La RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism) permet d'amplifier une région de taille variable chez différentes espèces et de digérer l'amplicon obtenu par différentes enzymes de restriction. L'identification est basée sur un critère de taille, qui témoigne du polymorphisme de restriction. L'inconvénient de la méthode est qu'il faut travailler sur des colonies isolées car l'application à des mélanges microbiens conduit à des profils électrophorétiques trop confus. Les produits de restriction des différentes espèces peuvent se superposer et se confondre. Kusters-van Someren *et al.* (1991) utilisent la RFLP avec comme régions cibles *pelA*, *pelB*, *pki* pour distinguer *A. niger* et *A. tubingensis*. Lorsque la région cible est le mtDNA, cette technique peut permettre de différencier *A. niger* et *A. brasiliensis*

de *A. tubingensis*, et *A. japonicus* de *A. aculeatus* (Varga *et al.*, 1993 et 1994 ; Hamari *et al.*, 1997). La RFLP a également permis de distinguer les espèces *A. japonicus*, *A. vadensis* et *A. aculeatus* lorsque les régions cibles sont *pelA*, *pki*, et rDNA (Parenicova *et al.*, 2001 ; de Vries *et al.*, 2005).

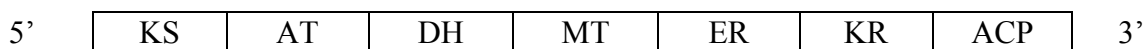
La RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). C'est une amplification aléatoire de fragments d'ADN par des amorces de 10 paires de bases. Si les deux sites d'hybridation sont suffisamment proches, et de position convenable, l'amplification PCR est possible. Une variabilité dans la séquence des sites entre individus sera détectée par un polymorphisme du nombre et de la longueur des fragments d'ADN amplifiés. C'est une technique facile à mettre en œuvre. L'inconvénient est la grande sensibilité de la technique. La flexibilité, le nombre de paire de bases des amorces utilisées et des conditions d'amplification contraignantes limitent la reproductibilité de la méthode. La RAPD-PCR a été utilisée par plusieurs auteurs pour l'étude de la variabilité génétique des *Aspergillus* noirs : *A. aculeatus* peut être différencié de *A. japonicus* (Hamari *et al.*, 1997), *A. brasiliensis* des autres *A. niger* agg (Varga *et al.*, 2000), *A. carbonarius* IN7 des autres isolats d'*A. carbonarius* (Kevei *et al.*, 1996).

L'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) est également basée sur l'amplification spécifique par PCR de fragments de restriction issus de la digestion de l'ADN génomique. C'est une combinaison de la RFLP et de la RAPD. L'ADN est d'abord digéré par des enzymes de restriction. Par la suite, des adaptateurs sont fixés sur les deux bouts des produits de digestion. Une amplification sélective par PCR est effectuée à l'aide d'amorces qui s'hybrident avec les adaptateurs. Cette technique est très efficace car le polymorphisme est révélé rapidement et facilement. L'AFLP a été utilisé avec succès pour différencier tous les *Aspergillus* noirs décrits (Perrone *et al.*, 2006 a et b ; Serra *et al.*, 2006 ; Varga *et al.*, 2007). Schmidt *et al.* (2004) utilisent également cette technique pour identifier les *A. carbonarius* isolés des grains de café. L'AFLP, comme la RFLP ont permis de séparer 3 espèces des *Aspergillus* noirs : *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. niger* et le groupe des *Aspergillus* noirs unisériés (Bau *et al.*, 2006 ; Perrone *et al.*, 2006 a et b).

Le séquençage est basé sur la méthode dite de terminaison de chaîne décrite par Sanger *et al.* (1977). C'est l'une des techniques performantes pour l'étude du polymorphisme. Il peut concerner des régions cibles de l'ADN ou bien le génome entier (ce qui est difficile à mettre en œuvre car le séquençage du génome entier est très onéreux, difficile et très long).

Le séquençage de diverses régions de l'ADN ribosomal, notamment les régions ITS₁ / ITS₂ et des régions D1 / D2 permettent une identification rapide et objective (Hirinckson *et al.*, 2005). La comparaison des séquences des diverses régions aux données disponibles dans les banques de données a permis d'obtenir des homologies allant de 91,9 % à 99,6 % pour la région D1 / D2, de 57,4 % à 98 % pour la région ITS₁ et de 75,6 % à 98,3 % pour la région ITS₂ (Hermosa *et al.*, 2001).

En plus de l'identification, la capacité de produire l'OTA peut être étudiée par l'amplification d'un fragment PKS. La structure générale d'une PKS fongique est la suivante :



Avec comme domaines principaux : Ketosynthase (KS), Acyl-Transfèrease (AT), Acyl Carrier Protein (ACP) et domaines optionnels : Ketoréductase (KR), Deshydratase (DH), Enyolréductase (ER), Méthyltransfèrease (MT).

Chez les moisissures, ces différents domaines sont responsables de la biosynthèse de plusieurs mycotoxines et autres métabolites secondaires. Le séquençage du génome des moisissures a révélé l'existence d'un grand nombre de gènes PKS (Yu *et al.*, 2005). En fonction des moisissures et des régions cibles, des amorces spécifiques, ont été trouvées. C'est le cas des primers Ac12RL-OTAF/ Ac12RL-OTAR chez *A. carbonarius* (Atoui *et al.*, 2007).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL

1- CACAO

Les cabosses de cacao (*Theobroma cacao* L.) ont été récoltées pendant les campagnes cacaoyères 2005, 2006 et 2007 dans la région de Kumba au Cameroun (Figure 17). La région de Kumba fournit plus de 50 % de la production nationale, soit en moyenne 60 000 tonnes de cacao marchand par an. Le climat est de type équatorial avec une pluviosité d'environ 3000 mm/an. Le type de cacao « Haut Amazonien » est le plus rencontré. La cueillette est faite à la main afin d'avoir selon le cas des fruits sains et bien mûrs ou ayant les caractéristiques désirées (cabosses naturellement abîmées).



Figure 17 : La localisation de la zone étude : la région de Kumba, située dans le Sud-Ouest du Cameroun.

2- SOUCHES FONGIQUES

Les souches d'*Aspergillus niger* (CECT 2091) et d'*A. tubingensis* (CBS 16179) ont été utilisées comme souches témoins pour l'identification des *Aspergillus* noirs isolés pendant le traitement du cacao. La souche CECT 2091 provient de la Colección Española de Cultivos Tipo (46100 Valencia Espagne), la souche CBS 16179 du Centraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn, Pays Bas).

Dans le cadre d'un essai avec inoculation, une souche d'*Aspergillus niger*, isolée au cours de ce travail, pendant le traitement post-récolte du cacao issu de la campagne cacaoyère 2005, et testée non productrice d'OTA sur milieu PDA et sur milieu riz (méthode FDA), a été utilisée (*A. niger* agg 18).

METHODES

1- FERMENTATIONS DU CACAO

Les fermentations ont été conduites chacune à partir de 50 kg de fèves. Deux types de fermentation ont été étudiées : fermentation en caisse où les fèves sont introduites dans des caisses en bois de dimension de 45 cm x 45 cm x 45 cm et fermentation en tas où les fèves sont versées sur des feuilles de bananier posées sur le sol. Le tas est par la suite recouvert par d'autres feuilles de bananier. Après récolte en champ, l'écabossage a été immédiat ou différé.

Campagne cacaoyère 2005

Pendant la campagne cacaoyère 2005, quatre variantes de traitement ont été étudiées (Figure 18). Elles sont fonction du type de fermentation, de l'état de la cabosse ou du délai d'écabossage : fermentation en tas des fèves issues de cabosses entières et ayant subi un écabossage sans délai (T1), fermentation en caisses de fèves du même type (T2), fermentation en tas de fèves issues de cabosses entières avec un écabossage retardé de 10 jours (T3) et fermentation en tas de fèves issues de cabosses blessées avec un écabossage également retardé de 10 j (T4). Dans ce dernier cas les cabosses ont été partiellement ouvertes après récolte. Le séchage est naturel (solaire) et dure entre 5 et 10 j. Trois fermentations de chaque type ont été effectuées au cours de la campagne cacaoyère : au début (septembre - octobre), au milieu (octobre - novembre) et à la fin de campagne (novembre-décembre).

Campagne cacaoyère 2006

La campagne 2006 a permis de comparer de nouveau les cabosses entières (T1') et les cabosses blessées (T4'). Un essai d'inoculation avec une souche d'*A. niger* non producteur d'OTA a été réalisé (T5) (Figure 19). L'incidence du stockage sur la microflore fongique totale et la production d'OTA ont également été étudiées en conservant les fèves issues des différents traitements dans les sacs en jute pendant 4 mois dans les conditions tropicales. Il est à noter que seul le début de la campagne cacaoyère a été étudié.

Campagne cacaoyère 2007

Au cours de la campagne 2007, la fermentation a porté sur un témoin (T1''), sur des fèves issues de cabosses naturellement abîmées sur l'arbre sans délai d'écabossage (T6), et des

fèves issues des cabosses abîmées sur l'arbre avec un délai d'écabossage de 10 j (T7). La microflore fongique de l'air, de la surface des cabosses et du matériel utilisé lors de la fermentation (sacs de jute, feuilles de bananier, caisses de fermentation) a également été étudiée (Figure 20). Comme pour l'année 2006, seul le début de la campagne a été étudié.

2- ETUDE DE LA MICROFLORE FONGIQUE

2- 1- Echantillonnage

Le prélèvement des échantillons de cacao a eu lieu à différentes étapes de la transformation (Figure 18, 19 et 20). Il s'agit des fèves non fermentées (A), fermentées et non séchées (B), fermentées et séchées au soleil (C). A chaque fois, 300 g de cacao ont été prélevés pour les analyses microbiologiques. Le dosage de l'OTA a été réalisé sur les fèves sèches (matière sèche > 90 %). Les prélèvements effectués aux étapes A et B ont été séchés pendant 48 h à l'étuve à 30°C afin de reproduire le séchage naturel en s'affranchissant des contaminations intervenant à ce stade.

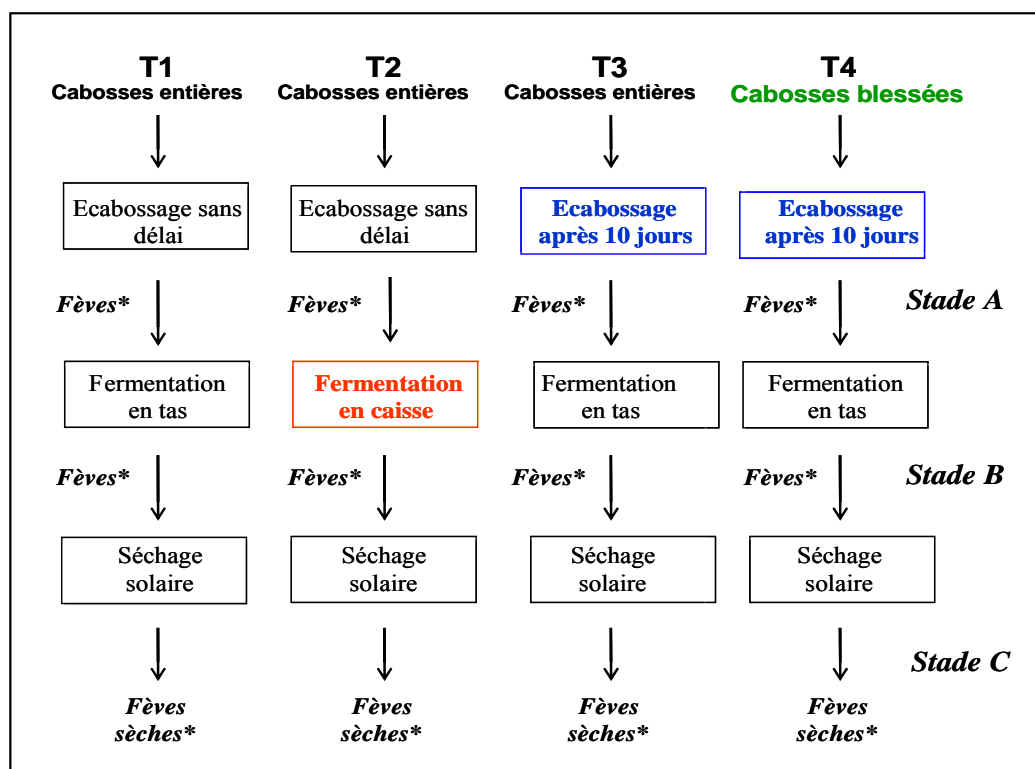


Figure 18: Traitements post-récolte étudiés pendant la campagne cacaoyère 2005

T1 : fermentation en tas des fèves issues de cabosses entières et ayant subi un écabossage sans délai

T2 : fermentation en caisse de fèves du même type

T3 : fermentation en tas de fèves issues de cabosses entières avec un écabossage retardé de 10 jours

T4 : fermentation en tas de fèves issues de cabosses blessées avec un écabossage également retardé de 10 j

* : stade de prélèvement

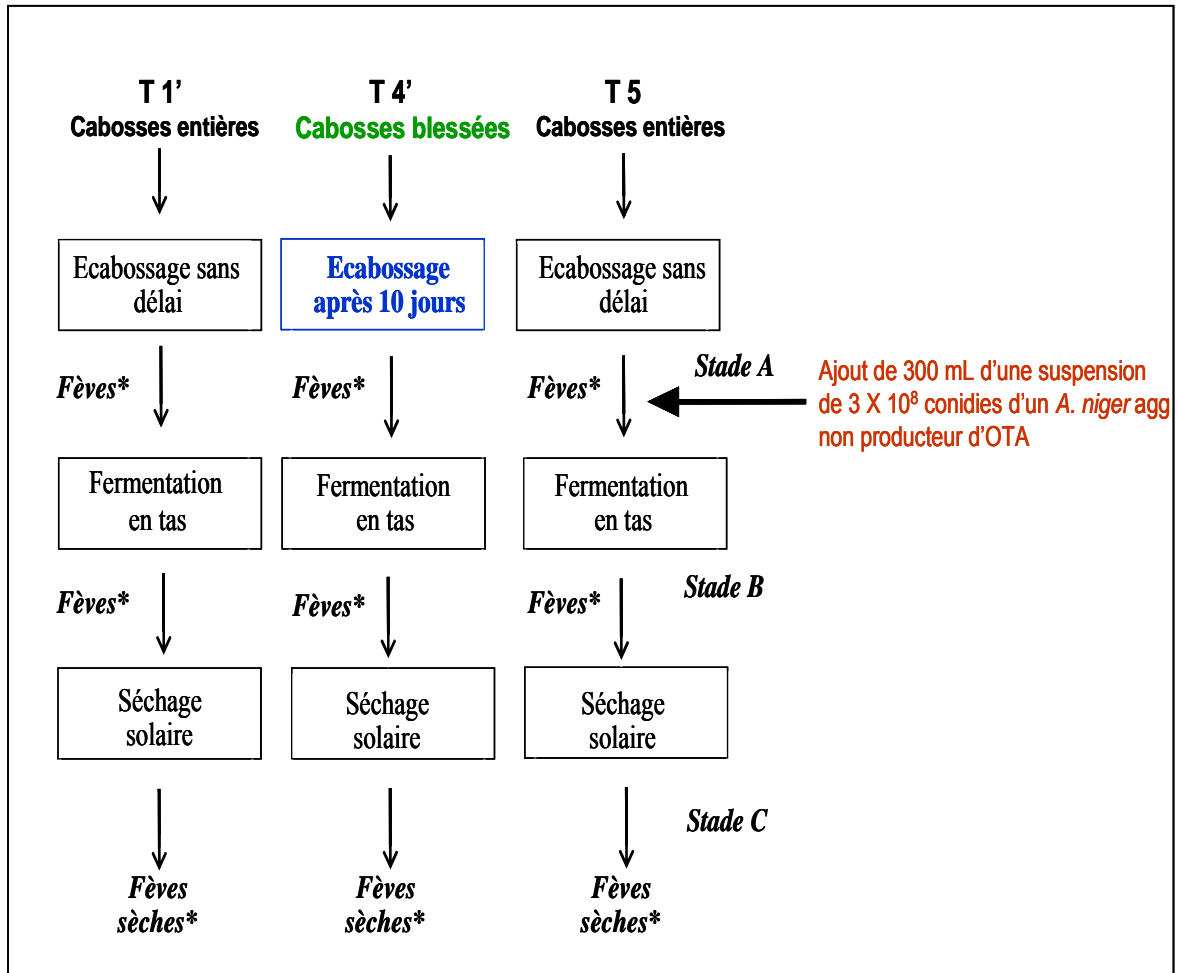


Figure 19: Traitements post-récolte étudiés pendant la campagne cacaoyère 2006

T1' : Répétition de T1

T4' : répétition de T4

T5 : essai avec inoculation d'un *A. niger* non producteur d'OTA

* : stade de prélèvement

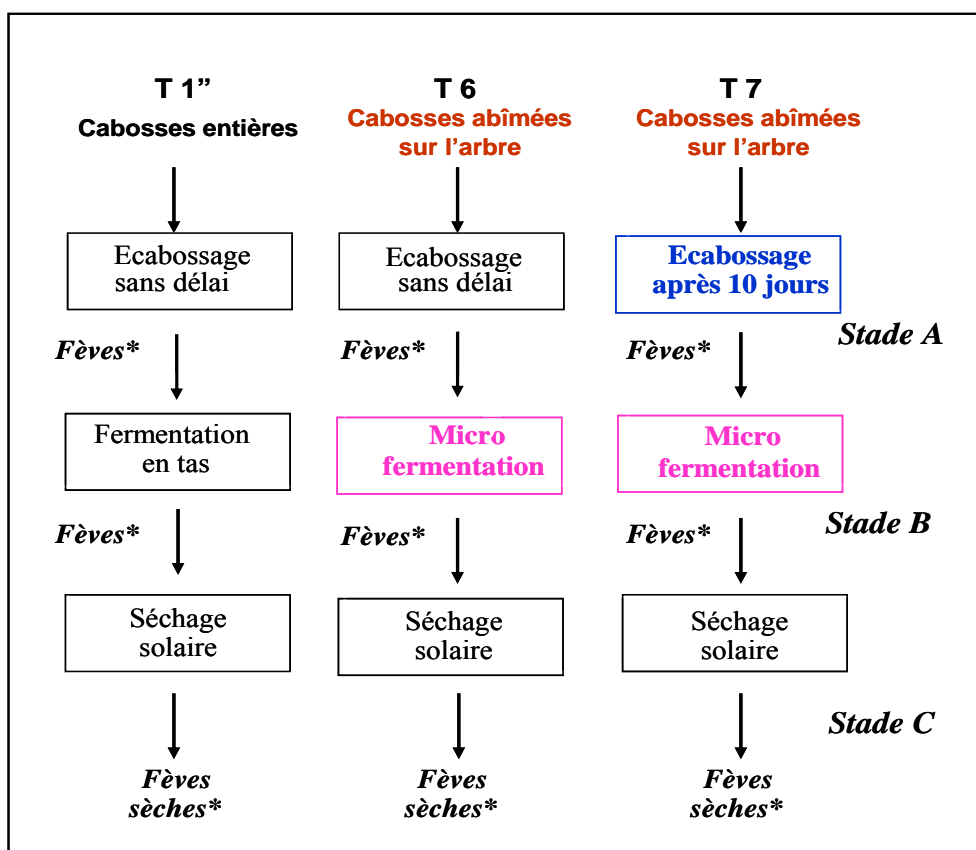


Figure 20: Traitements post-récolte étudiés pendant la campagne cacaoyère 2007

T''=T1

T6 : fermentation en caisse des fèves issues des cabosses abîmées sur l'arbre et avec écabossage sans délai

T7 : fermentation des mêmes fèves, mais avec écabossage après 10 jours

* : stade de prélèvement

2- 2- Milieux de culture

Divers milieux gélosés ont été utilisés pour la numération, l'isolement, l'étude des caractères phénotypiques et la production d'OTA.

Le principal milieu de culture a été le PDA : la gélose pomme de terre glucosée qui est un milieu de base pour l'isolement et la numération des moisissures et des levures. Afin de ralentir la croissance des bactéries, 9mL/L d'acide tartrique à 10 % (pour abaisser le pH à 3,5) et du chloramphénicol à 10 mg/mL ont été ajoutés. A l'exception du chloramphénicol qui est stérilisé par filtration car il est thermosensible, l'acide tartrique et le PDA ont été autoclavés à 121°C pendant 20 min. Le mélange est fait aseptiquement en surfusion (55°C).

Plusieurs autres milieux de culture décrits par Samson *et al.* (2004) ont été utilisés :

DG18 : c'est le dichloran 18 % glycérol agar. Le milieu DG18 est spécifiquement développé pour l'isolement et la numération des moisissures xérophiles. Il est constitué de peptone (5 g),

glucose (10 g), K_2HPO_4 (1 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g), dichloran 0,2 % dans l'éthanol (1 mL), glycérol (220 g), chloramphénicol (0,1 g), agar (15 g) dans 1L d'eau distillée.

Czapek agar : c'est un milieu constitué de $NaNO_3$ (3 g), KCl (0,5 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g), $FeSO_4 \cdot 4H_2O$ (10 mg), K_2HPO_4 (1 g), saccharose (30 g), agar (20 g) dans 1L d'eau distillée. Le pH du mélange est ajusté à 6,2 avant d'être autoclavé à 121°C pendant 20 min.

CYA : il est constitué de $NaNO_3$ (3 g), K_2HPO_4 (1 g), KCl (0,5 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g), $FeSO_4 \cdot 4H_2O$ (10 mg), extrait de levure (5 g), saccharose (30 g), agar (20 g) dans 1L d'eau. Le pH du mélange est ajusté à 6,0 - 6,5 avant d'être autoclavé à 121°C pendant 20 min.

MEA : le milieu malt extrait de malt est composé d'extrait de malt (30g), du peptone (3 g), de l'agar (15 g) dans 1L d'eau distillée. Le mélange est autoclavé à 121°C pendant 20 min.

2- 3- Numération par ensemencement des milieux en surface

Une numération de la population fongique a été réalisée par inoculation en surface du milieu PDA. Des essais préliminaires ont également été réalisés avec le milieu DG18. Cette méthode en surface favorise un développement uniforme des moisissures car elles ont un même accès à l'oxygène (Hocking, 1991). L'inoculum est obtenu par trempage de 15 fèves de cacao dans 90 mL d'une solution d'eau peptonée stérile (0,1% w/v) pendant 10 min (Hocking, 1991). Des dilutions décimales ont été réalisées puis 0,1mL de chaque dilution a été étalé sur les divers milieux de culture. Les boîtes de pétri sont ensuite incubées à 25°C pendant 5 à 7 jours. Le résultat est exprimé en UFC.g⁻¹ pour la flore fongique totale et pour les « *Aspergillus* noirs ». L'estimation de la population (N) est calculée selon la norme ISO (NF ISO 7218/A1) (AFNOR, 2002).

$$N = \frac{\sum C}{V (n_1 + 0,1n_2) d}$$

Avec $\sum C$ = somme des colonies comptées sur toutes les boîtes à la dilution retenue pour le comptage,
 V = volume de l'inoculum dans chaque boîte
 n₁ = nombre de boîtes retenues à la première dilution
 n₂ = nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution
 d = taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

La dispersion microbienne dans l'échantillon est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\delta = \left| \frac{\sum C}{B} \pm \frac{1,96 \sqrt{(\sum C)}}{B} \right| \frac{1}{d}$$

Avec B = V (n₁ + 0,1n₂) et pour un degré de sûreté de 95 %.

2- 4- Conditions de l'essai avec inoculation

La souche d'*A. niger* testée non productrice d'OTA a été cultivée sur milieu PDA pendant 5 jours. Une suspension à 3 x 10⁸ conidies/mL de cet *Aspergillus* est obtenue par grattage des boîtes de culture sur PDA avec une solution d'eau physiologique avec 0,01 % de Tween 80. L'inoculation est faite par aspersion et brassage de 300 mL de cette suspension dans 50 kg des fèves de cacao juste avant la mise en fermentation.

2- 5- Ensemencement direct

Afin de déterminer le pourcentage d'infection et d'accroître la sensibilité du dénombrement, un ensemencement direct a été fait en déposant aseptiquement des fèves de cacao à la surface de boîtes de milieu PDA (Hocking et Pitt, 1980). Cette méthode facilite la détection, non seulement des spores localisées sur la surface de la fève, mais aussi des hyphes qui ont pénétré et se sont développés dans les fèves. Trois fèves ont été déposées de façon stérile à la surface des boîtes de milieu PDA (fèves fraîches). Les boîtes ont été incubées à 25°C pendant 5 à 7 jours et le résultat est exprimé en pourcentage de fèves infectées.

3- IDENTIFICATION DES MOISSURES

3- 1- Caractères culturels sur les milieux de culture.

L'examen des cultures s'est fait à l'œil nu ou à la loupe. Les caractères culturels étudiés ont été la couleur des colonies (envers et endroit) et leur variation dans le temps, couleur et changement de couleur du milieu, la texture de la surface et l'odeur (Guiraud, 1998 ; Samson *et al.*, 2004). En plus du milieu PDA, les milieux Czapeck agar, CYA, MEA ont été utilisés pour l'identification des moisissures noires. Les caractères culturels sur les milieux CYA et MEA ont été comparés à ceux décrits par Samson *et al.* (2007).

3- 2- Caractères morphologiques microscopiques

L'examen microscopique a été fait grâce à des préparations à l'état frais. L'observation a été réalisée au grossissement x 100 et x 400. Les moisissures isolées ont été identifiées selon des critères morphologiques répertoriés en fonction des caractères suivants : hyphes cloisonnées ou non, caractéristiques et type de conidiogénèse, morphologie et structure des spores ou conidies (Guiraud, 1998 ; Samson *et al.*, 2004).

La confirmation de l'identification de quelques *Aspergillus* et *Penicillium* a été réalisée par des techniques moléculaires par la mycothèque de l'Université Catholique de Louvain en Belgique (BCCMTM/MULC Culture collection).

4- ETUDE DE LA PRODUCTION ET DOSAGE DE L'OTA

4- 1- Production d'OTA sur milieux gélosés

Le criblage des souches a été fait sur milieu PDA, puis confirmé sur milieux Czapek agar, CYA et MEA.

Pour chaque souche isolée, une suspension (3×10^6 conidies.mL⁻¹) a été réalisée par grattage d'une boîte de culture sur PDA avec une solution d'eau physiologique avec 0,01 % de Tween 80. Cinq microlitres de cette suspension sont déposés au centre d'une boîte de milieu PDA, Czapek et MEA et incubée à 25°C. Au bout de 7, 14 et 21 j d'incubation, une extraction directe est réalisée à partir de 3 disques de gélose prélevés au centre de la colonie. L'extraction est faite dans 2,5 mL de solvant (méthanol/acide formique 25:1, v/v) pendant 15 min dans un bain à ultrasons (Sùarez-Quiroz *et al.*, 2004).

La quantification de l'OTA est faite à partir des extraits, par HPLC avec une détection fluorimétrique (Shimadzu LC-10 ADVP, Japan) (Nakajima *et al.*, 1997). Les conditions opératoires sont les suivantes : boucle d'injection de 100 µL, colonne HPLC phase inverse C18, ODS granulométrie 5 µm avec pré-colonne identique, thermostatée à 35°C, débit isocratique de 1mL/min, longueur d'onde d'excitation de 333 nm et d'émission de 460 nm. Les teneurs sont calculées à partir d'une courbe d'étalonnage établie à partir d'un standard OTA (1µg.mL⁻¹ ; réf PD 226 R. Biopharm Rhône Ltd, Glasgow, UK).

4- 2- Production d'OTA sur milieu riz (Méthode FDA)

La production d'OTA a été également recherchée sur le milieu « riz » selon la méthode FDA qui est la méthode officielle (Tournas *et al.*, 2001). Dans un erlenmeyer de 500 mL, 50 mL d'eau distillée sont additionnés à 50 g de riz et stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 20 min. Le riz stérile estensemencé avec une suspension de 50×10^6 conidies.mL⁻¹ de la souche à tester. La culture est incubée à 25°C jusqu'à observer une croissance qui recouvre la surface et atteint le fond de l'erlenmeyer (15-20 jours). Après incubation, l'OTA est extraite par 150 mL de méthanol à chaud jusqu'à ébullition ; après homogénéisation, la suspension est filtrée et évaporée jusqu'à 20-25 mL.

L'OTA des extraits est détectée et quantifiée par HPLC (Nakajima *et al.*, 1997) comme précédemment décrit.

4- 3- Production d'OTA sur milieu cacao

Pour tester la production d'OTA sur cacao, 50 g de fèves de cacao (contrôlées sans OTA), sont stérilisées à l'autoclave à 121°C pendant 20 min. Les fèves stériles sont inoculées par 8 mL d'une suspension de 50×10^6 conidies.mL⁻¹ de souche à tester et incubées à 25°C pendant 10 et 20 j. L'extraction est faite dans une solution d'acétonitrile/eau, (60 : 40, v/v) pendant 40 min.

L'OTA des extraits est également détectée et quantifiée par HPLC comme décrit précédemment.

4- 4- Dosage de l'OTA dans les fèves de cacao

Les échantillons de fèves de cacao séchées ont été congelés à -80°C puis ont été broyés. Cinquante grammes de fèves broyées ont été extraits dans 200 mL de solvant (acétonitrile/eau, 60/40, v/v). Quatre millilitres d'extrait filtré ont été dilués dans 44 mL de tampon phosphate. Le mélange a été purifié sur colonne d'immunoaffinité (Ochraprep, Rhône Diagnostics, Scotland). L'OTA est éluée par 3 mL de méthanol et évaporée à sec sous courant d'azote à 70°C. Le résidu est repris par 1 mL de phase mobile (eau/acétonitrile/acide acétique, 51 : 48 : 1, v/v/v). La quantification est faite par HPLC suivant la méthode décrite précédemment (Annexe 1).

5- TECHNIQUES D'ETUDE DES FACTEURS INFLUANT LA CROISSANCE ET LA PRODUCTION D'OTA

5- 1- Incidence de l'activité de l'eau

Préparation des enceintes et milieu de culture

Des solutions de glycérol à différentes concentrations ont été préparées afin d'obtenir des activités de l'eau égales à 0,70 - 0,75 - 0,80 - 0,85 - 0,90 - 0,95 et 0,99. Ces solutions calibrées ont été versées dans le fond des dessiccateurs. Il est indispensable d'attendre 48 à 72 H pour avoir un équilibre dans l'enceinte.

Les milieux de culture à des activités de l'eau correspondantes à celle des enceintes ont été préparés. Des proportions variables de glycérol ont été ajoutées au milieu PDA avant autoclavage (Annexe 2).

Inoculation et culture

Les boîtes de pétri contenant les milieux de culture ont étéensemencées par une suspension de 3×10^6 conidies/mL et ont été introduites dans les enceintes correspondantes. Les dessiccateurs sont placés dans une chambre d'incubation à 28°C. Le diamètre des colonies est mesuré ainsi que la production d'OTA après 6, 12, 18 et 24 jours de culture (Sùarez-Quiroz *et al.*, 2005).

Au bout de ces différentes durées de culture, le prélèvement des disques de gélose, l'extraction et la quantification de l'OTA sont faites comme pour la production de l'OTA sur milieu PDA (Mat. et Méth. § 4-1)

5- 2- Effet des alcaloïdes

Des milieux de culture ont été préparés par supplémentation du milieu PDA, avec de la caféine (Sigma) à des concentrations de 0,0 - 1,0 - 1,5 - 2,0 et 2,5 g/L(p/v), de la théobromine (Sigma) à 0,0 - 1,0 - 1,5 - 2,0 et 2,5 g/L (p/v), et de l'épicatéchine (Sigma) à 0,0 - 3,5 g/L (p/v),

La caféine et la théobromine sont ajoutées au milieu PDA avant autoclavage tandis que l'épicatéchine est stérilisée aux UV et mélangée au PDA en surfusion (55°C). Sur ces milieux ont été ensemencés 5 μ L d'une suspension de 3×10^6 conidies d'*A. carbonarius* ou d'*A. niger* agg. La croissance apicale et la toxinogénèse sont étudiées après 7j de culture.

6- TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

6- 1- Production du mycélium

La souche à étudier est ensemencée sur le milieu PDA et incubée pendant 4 jours à 25°C. Une suspension de 3×10^6 conidies.mL⁻¹ de cette souche a été préparée par grattage d'une boîte de culture sur PDA dans une solution d'eau physiologique à 0,01 % de Tween 80. Huit microlitres de cette suspension de spores ont été ensemencés dans 100 mL de milieu Yeast-Malt (3 g d'extrait de levure, 3 g d'extrait de malt, 5 g de peptone et 5 g de glucose dans 1 L d'eau distillée). Les cultures sont mises à incuber à 25°C pendant 4 j sans agitation et à l'abri de la lumière. Le mycélium de couleur plus ou moins blanchâtre est filtré sur papier-filtre, congelé à -80°C pendant 24 h puis lyophilisé pendant 24 à 48 h.

6- 2- Extraction de l'ADN

L'ADN génomique est extrait selon les méthodes de Hoffman et Winston (1987) et Ausubel *et al.* (1995).

Dans un tube Eppendorf stérile de 2 mL, 50 à 100 mg de mycélium lyophilisé ont été broyés au vortex pendant 3 min par des billes de verre de diamètre égal à 0,45 µm en présence de 500 µL de tampon de lyse pH8 (mélange Tris-HCl 10 mM Sigma n°T7149, EDTA 1mM Fluka n°03610, NaCl 100 mM Sigma n°S3014, Triton X 100 2 % (p/v) Sigma n°T8787, SDS 1 % Gibco BRL n°5525UB), 250 µL de phénol (Uptima, Interchim) et 250 µL de chloroforme/alcool iso - amylique (Carlo Erba n°415154) (24/1, v/v). Par la suite, 500 µL de tampon TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8) ont été ajoutés et le mélange a été centrifugé à 10 000 g pendant 12 min. La phase aqueuse surnageante a été récupérée et une deuxième extraction au chloroforme/alcool iso - amylique a été faite. Un volume de 700 µL de chloroforme/alcool iso - amylique a été ajouté à la phase aqueuse récupérée et le mélange centrifugé à 10 000 g pendant 12 min. Après cette centrifugation, une nouvelle phase aqueuse est recueillie. Le culot d'ADN devient visible après ajout d'1 mL d'éthanol absolu à -20°C et centrifugation pendant 15 min à 18 000 g. Ce culot a été repris dans 370 µL de tampon TE pH8. Afin d'hydrolyser l'ARN résiduel qui pourrait nuire à la PCR, 30 µL de RNase (Roche n°109169) à 1 mg/mL ont été ajoutés et l'ensemble est incubé à 37°C pendant 15 min. De l'acétate d'ammonium 4M (10µL) et de l'éthanol absolu à -20°C (1mL) ont été ensuite ajoutés et le mélange est laissé pendant 1 h à -20°C, puis centrifugé pendant 15 min à 18 000 g. Le surnageant a été éliminé et le culot d'ADN est lavé par 1mL d'éthanol/eau ultra pure à

70 % (v/v). Le mélange a été ensuite centrifugé pendant 15 min à 18 000 g. Le culot d'ADN séché a été repris dans 50 µL de tampon TE pH8 et peut être conservé à -20°C.

La vérification de la qualité de l'extraction a été faite par une électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN obtenu. Le gel est obtenu par dissolution à chaud d'Agarose (Seakem LE Agarose n°50 000 E) à 0,8 % (p/v), dans le tampon 1XTAE (Tris-base Sigma n°T8524 2M, Acide Acétique Carlo-Erban n°401422 à 1M, EDTA Fluka n°03610 à 0,05M). Le mélange est refroidi sous agitation douce et 2,5 µL de Bromure d'Ethyidium (BET, Interchim n°UP 89244B) à 10 mg/mL est ajouté juste avant de « couler » le gel dans la cuve d'électrophorèse. Le BET contribue à rendre fluorescente la bande d'ADN sous les rayons UV. Pour l'électrophorèse, un mélange constitué d'1µL d'ADN, 9 µL d'eau ultra-pure et 1 µL de bleu de charge (Loading Buffer, ou BBS, Biomédicals n°2355204) est placé dans les puits. Le BBS sert à précipiter l'ADN au fond du puits.

L'électrophorèse est faite dans une cuve de type APELEX à 80 V pendant 90 min.

6- 3- Purification de l'ADN par Geneclean

Une électrophorèse sur un gel Low Melting Point (Sigma A 9414-25G) à 1 % a été faite et les bandes d'agarose contenant l'ADN total ont été découpées et récupérées dans un micro - tube Eppendorf taré et pesées. La purification de cet ADN a été faite par l'utilisation d'un kit de Geneclean ® (Bio101 Systems cat 1001-200, Q. Biogène) composé des billes de Glassmilk, de NaI et de la solution de New Wash.

Les morceaux de gel découpés ont été dissous sous agitation douce, dans un bain marie thermostaté à 55°C pendant 5 min, dans un volume de NaI correspondant au triple du poids du gel à dissoudre. L'ADN a été fixé sur les billes de Glassmilk par incubation dans la glace pendant 15 min. Une centrifugation (3000 g, 1 min) est réalisée afin de récupérer les billes imprégnées. Ces dernières ont été lavées 3 fois de suite par 500 µL d'une solution de lavage (New Wash). L'élution de l'ADN a été par la suite faite par ajout de 5 µL de tampon TE, incubation à 55°C pendant 3 min et centrifugation à 3000 g pendant 2 min. A partir des mêmes bandes d'agarose, trois séries d'élution ont été faites afin de récupérer au maximum l'ADN.

Comme précédemment, le contrôle de l'ADN purifié est faite par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 % dans les conditions opératoires précédemment citées.

6- 4- Détermination des *Aspergillus* noirs

6- 4- 1- PCR avec des amorces spécifiques

La technique de Gonzalez-Salgado *et al.* (2005) a été utilisée pour identifier certains *Aspergillus* noirs. L'ADN génomique purifié est amplifié par PCR avec les amorces suivantes, définies soit par Gonzalez-Salgado *et al.* (2005) (NIG et CAR), soit à partir des données de la base NCBI (JAP, HET, ELL et TUB) :

ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')

combiné aux primers spécifiques :

NIG (5'-CCG GAG AGA GGG GAC GGC-3') pour *Aspergillus niger*,

CAR (5'-AGA CAG GGG GAC GGC-3') pour *A. carbonarius*,

JAP (5'-GAG AAG ATT GGG GGT CGA GG-3') pour *A. japonicus*,

HET (5'-GGA AAA TGG TTG GAG AGG TCG-3') pour *A. heteromorphus*

ELL (5'-CCC GGG ATG GGG GAC GG-3') pour *A. ellipticus* et

TUB (5'-CCC GGA GAG GGG GAC GGC- 3') pour *A. tubingensis*

Le milieu réactionnel, d'un volume de 25 µL, est constitué de 2 µL d'ADN purifié dilué au 10^{ème}, 1 µL de dNTP (Sigma n°dNTP-100 à 10 mM), 2,5 µL de tampon 10XPCR, 2,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,25 µL de Taq DNA Polymérase à 5 U/µL, 1µL de primer ITS1 (10 pmoles/µL), 1µL de chaque primer spécifique (10 pmoles/µL), et de l'eau ultra pure Qsp (quantité suffisante pour avoir un volume total de 25 µL).

Il est à noter que la Taq-polymérase, le tampon 10 X PCR et le MgCl₂ sont contenus dans un kit de Taq-DNA polymérase (Sigma D 4545-1,5KU).

Les conditions de PCR sont les suivantes :

- *A. niger*, *A. tubingensis* et *A. carbonarius* : 1 cycle de 4 min 30 s à 95°C pour la dénaturation initiale, 25 cycles de 30 s à 95°C (Dénaturation), 25 s à 66°C (Annealing), 40 s à 72°C (Extension) et une extension finale de 5 min à 72°C.

- *A. japonicus*, *A. heteromorphus* et *A. ellipticus* : les conditions de PCR sont semblables à celles d'*A. niger* à la seule différence que les températures d'annealing sont respectivement de 62, 65 et 65,5°C.

La mise en évidence des produits d'amplification est faite par électrophorèse sur un gel d'agarose plus concentré (2 %), vu la taille des amplifias attendus. Le milieu réactionnel pour

l'électrophorèse est constituée de 8 µL d'extrait de PCR obtenu, 2 µL d'eau ultra pure et 1 µL de bleu de charge.

Les conditions d'électrophorèse restent 80V pendant 90 min.

6- 4- 2- Séquençage du fragment amplifié

Les amplifias de fragments ITS₁ / ITS₂ de quelques souches ont été séquencés au laboratoire « Millegène à Toulouse ». La comparaison des diverses séquences entre elles a été réalisée à l'aide du logiciel « Clustal : ww Multiple alignement » (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/MobyliPortal/portal.yp?form=clustalw-multialign>) (Thompson *et al.*, 1994).

L'alignement des diverses séquences avec celles déposées en banques a été effectué avec le logiciel « Blast » de la banque NCBI :

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome).

6- 4- 3- Amplification partielle d'un fragment PKS

L'amplification partielle d'un fragment PKS a été faite selon la méthode d'Atoui *et al.*, (2007) chez *A. carbonarius*.

Il s'agit d'une PCR spécifique avec comme amorces spécifiques :

Ac12RL_OTAF (5' AAT ATA TCG ACT ATC TGG ACG AGC G 3')

et Ac12RL_OTAR (5' CCC TCT AGC GTC TCC CGA AG 3')

Le milieu réactionnel est constitué de 2 µL d'ADN purifié (SM/10), 1 µL de dNTP (Sigma n°dNTP-100 à 10 mM), 2,5 µL de tampon 10XPCR, 2,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,25 µL de Taq DNA Polymérase à 5 U/µL, 1 µL du primer Ac12RL_OTAF (10 pmoles/µL), 1 µL de primer Ac12RL_OTAR (10 pmoles/µL), eau ultra pure qsp (quantité suffisante pour avoir un volume total de 25 µL).

Les conditions de PCR sont les suivantes :

Une dénaturation initiale à 94°C pendant 4 min, 35 cycles de 40 s à 94°C (Dénaturation), 40 s à 58°C (Annealing), 40 s à 72°C (Elongation) et finalement un cycle de 10 min à 72°C (Elongation finale).

La mise en évidence du fragment amplifié est faite par électrophorèse sur un gel d'agarose concentré (2 %). Le milieu réactionnel pour l'électrophorèse est constitué de 8 µL d'extrait de

PCR obtenu, 2 μ L d'eau ultra pure et 1 μ L de bleu de charge. Les conditions d'électrophorèse restent 80V pendant 90 min.

6- 5- RAPD-PCR

Des régions cibles de l'ADN génomique correspondant aux amorces ont été amplifiées de manière aléatoire grâce à l'utilisation d'un kit (Operon, GmbH-Allemagne, Oligonucleotide Data Sheet n° 55139745). Les primers effectivement utilisés sont l'OPC 04 (5'-CCGCATCTAC-3'), l'OPC 06 (5'-GAACGGACTC-3'), l'OPC 08 (5'-ACCTGGCCAC-3'), OPC 10 (5'-TGTCTGGGTG-3'), OPC 11 (5'-AAAGCTGCGG-3'), OPC 12 (5'-TGTCATCCCC-3'), OPC 13 (5'-AAGCCTCGTC-3'), OPC 14 (5'-TGCGTGCTTG-3').

Le milieu réactionnel est constitué de 2,5 μ L de tampon 10 X PCR, 2,5 μ L de $MgCl_2$ (25 mM), 1 μ L de dNTP (10 mM), 0,5 μ L de Taq DNA Polymérase (5 U/ μ L), 1 μ L d'ADN purifié (SM/10) comme matrice, 1 μ L de chaque primer (10 pmoles/ μ L), eau ultra pure (QSP).

Les conditions de PCR sont celles de Rinyu *et al.* (1995) : dénaturation initiale à 94°C pendant 2 min, puis 45 cycles [1 min à 92°C (Dénaturation), 1min à 35°C (Annealing), et 2 min à 72°C (extension)], et une extension finale à 72°C pendant 5 min.

La mise en évidence des amplifias est faite par électrophorèse sur un gel à 0,8 % d'Agarose dans le tampon 1 XTAE (Tris-acetate 40mM et l'EDTA 1,0 mM) à 80 V pendant 90 min.

6- 6- Construction des dendrogrammes

Les dendrogrammes sont construits à partir des différents profils d'amplification obtenus. Dans un premier temps, toutes les bandes sont repérées. Le profil d'amplification ayant le plus grand nombre de bandes servira de référence pendant la codification. Néanmoins, il est possible d'ajouter des bandes supplémentaires qui sont présentes ailleurs, mais absentes dans le profil d'amplification de référence. Par rapport à la référence, les bandes des différents profils sont codifiées par 0 (absence) ou 1 (présence). Ces données sont par la suite interprétées par le logiciel STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc, USA) et les dendrogrammes sont construits, faisant apparaître le pourcentage de désagrément (non homologie) entre les différentes souches étudiées.

RESULTATS ET DISCUSSION

1- ETUDE DE LA MICROFLORE FONGIQUE ET DES ASPERGILLUS NOIRS PENDANT LE TRAITEMENT DU CACAO

Cette étude a été conduite dans le but de dénombrer et identifier la microflore fongique présente au cours du traitement post - récolte du cacao, d'étudier la fréquence des souches productrices d'OTA au sein de la flore fongique pendant les campagnes cacaoyères 2005, 2006 et 2007 au Cameroun. Afin de caractériser la microflore associée aux différentes étapes du traitement, nous avons suivi la chaîne de préparation du cacao, depuis l'écabossage jusqu'à l'obtention du cacao marchand. En fonction des campagnes cacaoyères, plusieurs variantes de traitement ont été étudiées.

Pour la campagne cacaoyère 2005, l'étude a porté sur quatre types de traitement : fermentation en tas des fèves issues de cabosses entières et ayant subi un écabossage sans délai (T1), fermentation en caisse de fèves du même type (T2), fermentation en tas de fèves issues de cabosses entières avec un écabossage retardé de 10 jours (T3) et fermentation en tas de fèves issues de cabosses blessées manuellement pour l'étude avec un écabossage également retardé de 10 j (T4). L'échantillonnage a été fait en début (septembre - octobre), milieu (octobre - novembre) et fin de campagne cacaoyère (novembre - décembre).

La campagne 2006 a permis de comparer à nouveau les cabosses entières (témoin T1') et les cabosses blessées (T4'). L'inoculation, avant la mise en fermentation, avec des conidies d'une souche appartenant au groupe d'*A. niger* aggregate (montrée non productrice d'OTA lors de la première campagne cacaoyère) a permis d'étudier le potentiel colonisateur et inhibiteur de la toxino-génèse de cette souche (T5). Cet essai avait également pour but d'étudier la tracabilité de la souche (après étude génotypique ; voir chapitre IV des résultats) et de mettre en évidence un possible effet de lutte biologique par compétition. Les fèves de cacao marchand issus des traitements étudiés (T1', T4' et T5) ont été stockées pendant 4 mois sous conditions tropicales dans des sacs en jute. La microflore fongique et l'OTA ont été suivies tous les deux mois pendant le stockage. Seul le début de la campagne cacaoyère a été étudié.

Au cours de la campagne 2007, les fermentations ont porté sur les fèves de cabosses entières (témoin T1''), les fèves issues des cabosses abîmées naturellement sur l'arbre sans délai d'écabossage (T6), et les fèves issues des cabosses abîmées sur l'arbre avec délai d'écabossage de 10 jours (T7). La microflore fongique de l'air, de la surface des cabosses et du matériel utilisé lors de la fermentation (sacs de jute, feuilles de bananier, caisses de

fermentation) a également été étudiée. Comme pendant la campagne cacaoyère 2006, seul le début de la campagne cacaoyère a été étudié.

1- 1- Campagne cacaoyère 2005

1- 1- 1- Evolution qualitative de la microflore fongique

Le Tableau 8 donne l'identification de la microflore fongique totale dans les échantillons de cacao issus des différentes fermentations aux trois stades de la campagne cacaoyère. Les souches isolées appartiennent essentiellement aux genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Fusarium*. Le genre *Aspergillus* présente différentes espèces : plusieurs sont de couleur noire et correspondent à la section Nigri qui contient des espèces reconnues comme productrices d'OTA (que nous classerons présomptivement sur des critères morphologiques comme *Aspergillus niger* agg et *Aspergillus carbonarius*). Il n'existe pas de différence significative pour les moisissures isolées en fonction du type de fermentation (tas ou caisse) ou du stade de la campagne cacaoyère. L'intégrité de la cabosse, et à un degré moindre, le délai d'écabossage influencent la diversité qualitative des moisissures. Les cabosses blessées présentent une forte prolifération d'*Aspergillus carbonarius*, *A. niger* et *Fusarium spp* au niveau des ouvertures de la cabosse. La Figure 21 donne l'aspect phénotypique de quelques moisissures isolées.

Tableau 8 : Identification de la microflore fongique isolée pendant les traitements technologiques (aux 3 stades étudiés de la campagne 2005).

Type de traitement	Stade de prélèvement	Moisissures isolées
T1	A	-
	B	<i>A. versicolor</i> , <i>Mucor spp</i> , <i>A. niger</i> agg, <i>Geotrichum spp</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Fusarium spp</i> , <i>Rhizopus nigricans</i>
	C	<i>A. tamarii</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>A. niger</i> agg
T2	A	-
	B	<i>A. versicolor</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>Fusarium spp</i> , <i>A. niger</i> agg
	C	<i>Rhizopus nigricans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. niger</i> agg
T3	A	<i>P. crustosum</i> , <i>Fusarium spp</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>P. sclerotiorum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Mucor spp</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>A. niger</i> agg
	B	<i>Rhizopus nigricans</i> , <i>Mucor spp</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Syncephalastrum racemosum</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>P. sclerotiorum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Geotrichum spp</i> , <i>Trichoderma spp</i> , <i>A. niger</i> agg
	C	<i>Geotrichum spp</i> , <i>Mucor spp</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. niger</i> agg
T4	A	<i>Scopulariopsis spp</i> , <i>A. niger</i> agg, <i>Syncephalastrum racemosum</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>Mucor spp</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>A. carbonarius</i>
	B	<i>A. versicolor</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>Mucor spp</i> , <i>Scopulariopsis spp</i> , <i>Syncephalastrum racemosum</i> , <i>A. niger</i> agg, <i>P. crustosum</i>
	C	<i>P. crustosum</i> , <i>P. sclerotiorum</i> , <i>Fusarium spp</i> , <i>Scopulariopsis spp</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Trichoderma virens</i> , <i>A. niger</i> agg, <i>A. carbonarius</i>

T1 : Fermentation en tas des fèves issues de cabosses entières et ayant subi un écabossage sans délai

T2 : Fermentation en caisse de fèves du même type

T3 : Fermentation en tas de fèves issues de cabosses entières avec un écabossage retardé de 10 jours

T4 : Fermentation en tas de fèves issues de cabosses blessées avec un écabossage également retardé de 10 j

A : Fèves non fermentées

B : Fèves fermentées et non séchées

C : Fèves fermentées et séchées

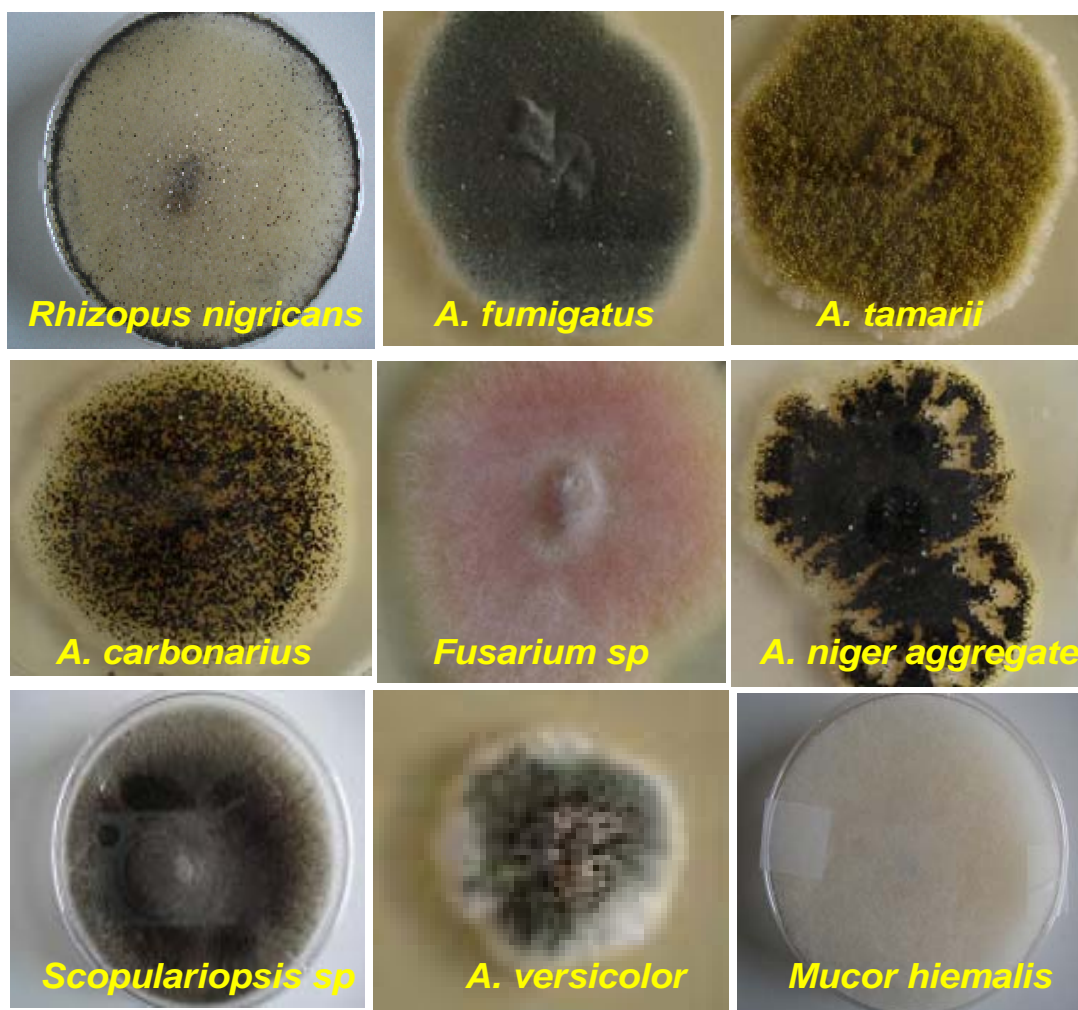


Figure 21 : Moisissures isolées au cours des traitements technologiques

1- 1- 2- Evolution quantitative de la microflore fongique

Le Tableau 9 donne la quantification des moisissures totales et moisissures noires isolées pendant les traitements technologiques. Les moisissures sont retrouvées pour toutes les conditions mais leur nombre varie selon le stade de prélèvement. L'étape B du traitement T4 montre le niveau de contamination le plus élevé à la fois pour les moisissures totales et pour les *Aspergillus* noirs. Des concentrations maximales de $5,5 \pm 1,4 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ et $1,4 \pm 0,2 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ sont obtenues respectivement pour ces deux catégories. Il faut noter que le nombre d'*Aspergillus* noirs (*A. carbonarius* et *A. niger* agg) n'est pas identique tout au long de la campagne cacaoyère. Ces *Aspergillus* sont moins fréquents en début de campagne, et ne sont rencontrés qu'au stade B (après la fermentation) sauf pour les cabosses blessées. Les cacaos issus de milieu et fin de campagne sont davantage contaminés, quel que soit le stade de prélèvement et cette contamination est d'autant plus importante que la cabosse est

endommagée. L'identification des souches isolées montre que les *Aspergillus niger* agg sont prépondérants (90 à 100 % des *Aspergillus* noirs). *Aspergillus carbonarius* se retrouve essentiellement au niveau des fèves non fermentées (A) issues des cabosses blessées (T4).

Tableau 9 : Quantification des moisissures totales et moisissures noires isolées pendant les traitements technologiques (campagne 2005).

		Stade de prélèvement	Moisissures totales (UFC.g ⁻¹)	Moisissures noires (UFC.g ⁻¹)	A. carbonarius (% par rapport aux A. noirs)
Début de campagne (Septembre- Octobre)	T1	A	nd	nd	-
		B	$4,0 \pm 1,4 \times 10^7$	$5,2 \pm 1,8 \times 10^6$	0
		C	$3,7 \pm 0,5 \times 10^6$	nd	-
	T2	A	nd	nd	-
		B	$4,5 \pm 0,8 \times 10^7$	$1,3 \pm 0,2 \times 10^6$	0
		C	$4,0 \pm 1,9 \times 10^4$	nd	-
	T3	A	$2,6 \pm 0,7 \times 10^5$	nd	-
		B	$5,0 \pm 0,8 \times 10^7$	$8,7 \pm 4,2 \times 10^5$	0
		C	$3,5 \pm 2,6 \times 10^4$	nd	-
	T4	A	$1,6 \pm 0,6 \times 10^5$	$1,4 \pm 0,5 \times 10^5$	75
		B	$5,5 \pm 1,4 \times 10^7$	$2,2 \pm 0,2 \times 10^6$	0
		C	$1,0 \pm 0,4 \times 10^6$	$1,3 \pm 0,57 \times 10^5$	0
Milieu de campagne (Octobre- Novembre)	T1	A	nd	nd	-
		B	$7,7 \pm 1,9 \times 10^6$	$2,5 \pm 0,6 \times 10^6$	0
		C	$5,2 \pm 0,7 \times 10^6$	$3,5 \pm 0,5 \times 10^6$	0
	T2	A	nd	nd	-
		B	$2,3 \pm 0,5 \times 10^6$	nd	-
		C	$4,2 \pm 2,0 \times 10^4$	$2,8 \pm 1,3 \times 10^4$	0
	T3	A	$3,2 \pm 0,4 \times 10^6$	$5,5 \pm 0,7 \times 10^5$	0
		B	$2,0 \pm 0,3 \times 10^7$	$3,4 \pm 0,5 \times 10^6$	0
		C	$4,9 \pm 0,7 \times 10^5$	$4,9 \pm 0,7 \times 10^6$	0
	T4	A	$6,0 \pm 1,7 \times 10^6$	$1,6 \pm 0,5 \times 10^6$	38
		B	$2,0 \pm 0,3 \times 10^7$	$1,4 \pm 0,2 \times 10^7$	0
		C	$7,8 \pm 0,8 \times 10^6$	$4,1 \pm 0,5 \times 10^6$	0
Fin de campagne (Novembre- Decembre)	T1	A	nd	nd	-
		B	$7,7 \pm 1,9 \times 10^6$	$1,5 \pm 0,2 \times 10^6$	0
		C	$5,2 \pm 0,7 \times 10^6$	$2,0 \pm 0,2 \times 10^5$	0
	T2	A	nd	nd	-
		B	$2,3 \pm 0,5 \times 10^6$	$3,0 \pm 0,8 \times 10^6$	0
		C	$4,2 \pm 2,0 \times 10^4$	$4,6 \pm 0,7 \times 10^4$	0
	T3	A	$1,8 \pm 0,9 \times 10^5$	$9,0 \pm 4,0 \times 10^3$	0
		B	$5,4 \pm 0,5 \times 10^7$	$2,7 \pm 0,3 \times 10^6$	0
		C	$3,1 \pm 0,5 \times 10^6$	$2,5 \pm 0,4 \times 10^5$	0
	T4	A	$2,9 \pm 0,4 \times 10^7$	$7,01 \pm 0,9 \times 10^6$	50
		B	$2,5 \pm 0,3 \times 10^7$	$4,0 \pm 0,5 \times 10^6$	0
		C	$2,5 \pm 0,5 \times 10^6$	$3,0 \pm 0,6 \times 10^5$	0

A, B, C et T1-T4 définis au Tableau 8

nd = non détectable ; Limite de détection 10 UFC.g⁻¹

1- 1- 3- Etude du taux de contamination des fèves de cacao par les moisissures

Le degré d'infection des fèves par les moisissures a été étudié par ensemencement direct sur le milieu de culture. La forte contamination des fèves de cacao par les moisissures est confirmée (Tableau 10). Le taux de contamination par les moisissures totales est de 100 % quel que soit le type de traitement. Les moisissures noires sont trouvées après la fermentation et le séchage (lorsque l'écabossage s'est fait sans délai) et à tous les stades de transformation lorsque l'écabossage est différé et les cabosses blessées. Ces résultats confirment ceux des comptages.

Tableau 10 : Taux de contamination des fèves par les moisissures totales et les moisissures noires (campagne 2005)

	Type de Traitement	Stade de prélèvement	Taux de contamination par moisissures totales	Taux de contamination par <i>Aspergillus</i> noirs
Début de campagne (Septembre- Octobre)	T1	A	0/6	0/6
		B	6/6	0/6
		C	6/6	2/6
	T2	A	0/6	0/6
		B	6/6	5/6
		C	6/6	2/6
	T3	A	6/6	0/6
		B	6/6	0/6
		C	6/6	0/6
	T4	A	6/6	4/6
		B	6/6	3/6
		C	6/6	3/6
Milieu de campagne (Octobre- Novembre)	T1	A	0/6	0/6
		B	6/6	2/6
		C	6/6	5/6
	T2	A	0/6	0/6
		B	6/6	0/6
		C	6/6	2/6
	T3	A	6/6	2/6
		B	6/6	3/6
		C	6/6	5/6
	T4	A	6/6	4/6
		B	6/6	3/6
		C	6/6	5/6
Fin de campagne (Novembre- Decembre)	T1	A	0/6	0/6
		B	6/6	0/6
		C	6/6	2/6
	T2	A	0/6	0/6
		B	6/6	0/6
		C	6/6	2/6
	T3	A	6/6	1/6
		B	6/6	4/6
		C	6/6	4/6
	T4	A	6/6	2/6
		B	6/6	3/6
		C	6/6	5/6

A, B, C et T1-T4 sont définis au Tableau 8

1- 2- Campagne cacaoyère 2006

1- 2- 1- Etude de la microflore fongique au cours du traitement

1- 2- 1- 1- Etude qualitative

Pendant le traitement du cacao, les moisissures isolées des fèves issues de la campagne cacaoyère 2006 (début de campagne : septembre - octobre) sont presque identiques à celles de la campagne 2005 (Tableau 11). Elles appartiennent essentiellement aux genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Fusarium*. Contrairement à la campagne cacaoyère 2005, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium sclerotiorum*, *P. paneum*, et *P. crustosum* n'ont pas été isolés. Il n'existe pas de différence significative pour les moisissures isolées en fonction du type du traitement subi. *A. niger* agg est la seule espèce potentiellement toxigène isolée au cours du traitement technologique. Avant la mise en fermentation, l'inoculation des fèves par une souche d'*A. niger* agg témoin testée non productrice d'OTA (T5) n'a entraîné aucune particularité quelconque pour ce qui est de la qualité de la microflore fongique isolée aux différents stades de prélèvement.

Tableau 11 : Microflore fongique isolée pendant les traitements technologiques (campagne 2006)

Type de traitement	Stade de prélèvement	Moisissures isolées
T1'	A	-
	B	<i>Trichoderma</i> spp, <i>A. versicolor</i> , <i>Geotrichum candidum</i>
	C	<i>A. tamarii</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>A. niger</i> agg
T4'	A	<i>Scopulariopsis</i> spp, <i>Fusarium</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Geotrichum candidum</i>
	B	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>Mucor</i> spp, <i>A. niger</i> agg, <i>Scopulariopsis</i> spp
	C	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>Mucor</i> spp, <i>A. niger</i> agg
T5	A	-
	B	<i>Geotrichum</i> spp, <i>Mucor</i> spp, <i>A. fumigatus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. niger</i> agg
	C	<i>Geotrichum candidum</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. niger</i> agg

A, B, C et T1', T4' sont définis au Tableau 8

T5 : Fermentation avec inoculation, avant la mise en fermentation, des fèves par une souche d'*A. niger* agg témoin testée non productrice

1- 2- 1- 2- Etude quantitative

La quantification des moisissures totales et des moisissures noires est donnée dans le Tableau 12. Comme pendant la campagne cacaoyère 2005, les moisissures sont retrouvées dès

l'écabossage lorsque les fèves sont issues des cabosses blessées. Pour un traitement donné, la teneur en moisissures reste une fonction du stade de prélèvement. La fermentation avec inoculation d'une suspension d'*A. niger* agg (T5) donne les teneurs en moisissures les plus importantes. La concentration maximale est obtenue après la fermentation des fèves issues du traitement T5, aussi bien pour les moisissures totales que pour les *Aspergillus* noirs. Les valeurs sont de $10,5 \pm 4,20 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ et $5,25 \pm 2,10 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ respectivement. Ayant inoculé 3×10^8 conidies d'*A. niger* agg témoin dans 50 kg de fèves avant la mise en fermentation ceci correspond à $6,0 \times 10^3$ UFC.g⁻¹. On observe en comparant au stade B l'essai inoculé (T5) et l'essai témoin (T1'), une augmentation par un facteur d'environ 3 de la quantité de moisissures totales. Au même stade, les moisissures noires vont de non détectable (nd) à $5,25 \pm 2,10 \times 10^6$. Même si ceci suggère une bonne implantation de l'inoculum, seule l'étude moléculaire permettra de le confirmer.

Tableau 12: Quantification des moisissures totales et moisissures noires isolées pendant la campagne cacaoyère 2006.

Type de Traitement	Stade de prélèvement	Moisissures totales (UFC.g ⁻¹)	Moisissures noires (UFC.g ⁻¹)	<i>A. carbonarius</i> (% par rapport aux <i>A. noirs</i>)
T1'	A	nd	nd	-
	B	$3,0 \pm 0,43 \times 10^6$	nd	-
	C	$0,37 \pm 0,08 \times 10^6$	$0,35 \pm 0,08 \times 10^6$	0
T4'	A	$1,02 \pm 0,14 \times 10^6$	nd	-
	B	$3,75 \pm 0,84 \times 10^6$	$2,17 \pm 0,49 \times 10^6$	0
	C	$0,38 \pm 0,08 \times 10^6$	$0,22 \pm 0,05 \times 10^6$	0
T5	A	$6,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10^3$	-
	B	$10,5 \pm 4,20 \times 10^6$	$5,25 \pm 2,10 \times 10^6$	0
	C	$0,12 \pm 0,09 \times 10^6$	$0,04 \pm 0,02 \times 10^6$	0

A, B, C et T1', T4' sont définis au tableau 8

T5 est défini au tableau 11

nd = non détectable ; Limite de détection 10 UFC.g⁻¹

1- 2- 2- Etude du taux de contamination des fèves

Une forte contamination des fèves de cacao par les moisissures est observée (Tableau 13). A l'exception des fèves non fermentées (stade A), du traitement témoin (T1'), le taux de contamination par les moisissures totales est de 100 % quelque soit le type de traitement. Les moisissures noires sont généralement retrouvées dès la fermentation à l'exception du traitement témoin où elles sont seulement retrouvées après le séchage.

Tableau 13 : Taux de contamination par les moisissures totales et les moisissures noires

Type de Traitement	Stade de prélèvement	Taux de contamination par moisissures totales	Taux de contamination par <i>Aspergillus</i> noirs
T1'	A	0/6	0/6
	B	6/6	0/6
	C	6/6	2/6
T4'	A	6/6	0/6
	B	6/6	3/6
	C	6/6	4/6
T5	A	6/6	4/6
	B	6/6	3/6
	C	6/6	4/6

A, B, C et T1', T4' sont définis au tableau 8

T5 est défini au tableau 11

1- 2- 3- Etude de la microflore fongique au cours du stockage

Cette partie a pour but d'étudier l'évolution de la microflore fongique et l'OTA des fèves de cacao à partir de l'obtention du cacao marchand jusqu'à l'acheminement vers l'Europe (ou autres pays transformateurs). Durant ce transit, il peut s'écouler une durée maximale de 4 mois. De ce fait, les fèves de cacao marchand obtenues des traitements T1', T4' et T5 ont été introduites dans des sacs en jute et stockées sous conditions tropicales pendant 4 mois. La microflore fongique est étudiée tous les deux mois. L'OTA a été également dosée (voir chapitre II, des Résultats).

1- 2- 3- 1- Etude qualitative

La microflore fongique isolée pendant le stockage des fèves de cacao sous conditions tropicales reste presque identique à celle isolée durant le traitement post-récolte (Tableau 14). On note l'apparition d'une espèce non ochratoxinogène *Cladosporium cladosporium* dès 2 mois de stockage, espèce qui devient prépondérante par la suite. Quelle que soit la durée du stockage, *A. niger* agg est le seul *Aspergillus* noir isolé après le traitement témoin (T1') et le traitement à partir des fèves issues des cabosses blessées (T4'). *Aspergillus carbonarius* ne sera isolé qu'à partir de deux mois de conservation pour l'essai avec inoculation (T5) ce qui est contraire à l'effet recherché.

Tableau 14 : Identification de la microflore fongique isolée pendant le stockage (campagne cacaoyère 2006).

Type de traitement	Stade de prélèvement	Moisissures isolées
T1'	C	<i>A. tamarii</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>A. niger</i> agg
	D	<i>Scopulariopsis</i> spp, <i>Cladosporium cladosporium</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. niger</i> agg, <i>A. fumigatus</i> , <i>Mucor hiemalis</i>
	E	<i>Fusarium</i> spp, <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Cladosporium</i> spp, <i>A. niger</i> agg
T4'	C	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>Mucor</i> spp, <i>A. niger</i> agg
	D	<i>A. carbonarius</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> agg, <i>A. tamarii</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>Scopulariopsis</i> spp, <i>Penicillium crustosum</i> , <i>Mucor hiemalis</i>
	E	<i>Rhizopus nigricans</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Cladosporium</i> spp, <i>A. niger</i> agg
T5	C	<i>Geotrichum candidum</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. niger</i> agg
	D	<i>A. fumigatus</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>A. niger</i> agg, <i>Scopulariopsis</i> spp, <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>Cladosporium cladosporium</i> , <i>Penicillium sclerotiorum</i>
	E	<i>Rhizopus nigricans</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Cladosporium</i> spp, <i>A. niger</i> agg, <i>A. carbonarius</i>

C, D, E : stockage pendant 0, 2 et 4 mois.

T1', T4' sont définis au Tableau 8

T5 est défini au Tableau 11

1- 2- 3- 2- Etude quantitative

Indépendamment du traitement, la microflore fongique des fèves de cacao subit une variation quantitative avec le stockage (Tableau 15). La plus forte concentration en moisissures est obtenue à deux mois de stockage et baisse par la suite. L'essai avec inoculation (T5) représente le traitement le plus contaminé car les plus fortes teneurs en moisissures y sont obtenues. Elles sont de $3,7 \pm 0,84 \times 10^9$ UFC.g⁻¹ et $1,15 \pm 0,26 \times 10^9$ UFC.g⁻¹ pour les moisissures totales et *Aspergillus* noirs respectivement, avec une forte prépondérance d'*A. carbonarius*.

Tableau15: Evolution quantitative des moisissures totales et moisissures noires pendant le stockage (campagne 2006).

Type de traitement	Durée Stockage (mois)	Moisissures totales (UFC.g ⁻¹)	Moisissures noires (UFC.g ⁻¹)	<i>A. carbonarius</i> (% par rapport aux <i>A. noirs</i>)
T1'	0	$3,7 \pm 0,84 \times 10^5$	$3,5 \pm 0,80 \times 10^5$	0
	2	$32 \pm 0,78 \times 10^7$	$5,76 \pm 0,14 \times 10^7$	0
	4	$1,1 \pm 0,45 \times 10^5$	$0,5 \pm 0,02 \times 10^4$	0
T4'	0	$3,8 \pm 0,85 \times 10^6$	$2,2 \pm 0,48 \times 10^6$	0
	2	$37,5 \pm 0,85 \times 10^6$	$9,37 \pm 0,21 \times 10^6$	0
	4	$2,95 \pm 0,75 \times 10^5$	$1,35 \pm 0,50 \times 10^5$	0
T5	0	$1,2 \pm 0,49 \times 10^5$	$0,3 \pm 0,13 \times 10^5$	0
	2	$3,7 \pm 0,84 \times 10^9$	$1,15 \pm 0,26 \times 10^9$	50
	4	$1,5 \pm 0,53 \times 10^5$	$0,1 \pm 0,03 \times 10^8$	75

T1', T4' sont définis au Tableau 8

T5 est défini au Tableau 11

nd = non détectable ; Limite de détection 10 UFC.g⁻¹

1- 3- Campagne cacaoyère 2007

1- 3- 1- Etude de la microflore fongique au cours des traitements

1- 3- 1- 1- Etude qualitative

La microflore fongique isolée pendant la campagne cacaoyère 2007 (septembre - octobre) reste assez proche de celle des deux campagnes précédentes (Tableau 16). Quel que soit le type de traitement, elle est essentiellement constituée des genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Fusarium*. Il n'existe pas de différence significative entre les moisissures isolées en fonction du type du traitement subi. *A. niger* agg et *A. carbonarius* sont les souches potentiellement toxigènes isolées au cours du traitement post-récolte.

Tableau 16 : Identification de la microflore fongique isolée pendant les traitements technologiques (campagne 2007).

Type de traitement	Stade de prélèvement	Moisissures isolées
T1''	A	-
	B	<i>Mucor sp</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>Fusarium sp</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Geotrichum candidum</i>
	C	<i>Mucor sp</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>A. niger</i> agg, <i>P. paneum</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>A. fumigatus</i>
T6	A	<i>Scopulariopsis spp</i> , <i>Fusarium sp</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Geotrichum candidum</i>
	B	<i>A. tamarii</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>Mucor spp</i> , <i>A. niger</i> agg, <i>Scopulariopsis spp</i> , <i>Fusarium sp</i> , <i>A. fumigatus</i>
	C	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>Fusarium spp</i> , <i>Mucor spp</i> , <i>Rhizopus nigricans</i>
T7	A	<i>Rhizopus nigricans</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>Mucor sp</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>Fusarium sp</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>A. fumigatus</i>
	B	<i>Geotrichum spp</i> , <i>Mucor spp</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. niger</i> agg, <i>A. carbonarius</i> , <i>Scopulariopsis spp</i> , <i>Rhizopus nigricans</i>
	C	<i>Geotrichum candidum</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. niger</i> agg, <i>A. fumigatus</i>

A, B, C, T1' sont définis au Tableau 8

T6 : Fermentation en caisse des fèves issues des cabosses abîmées naturellement sur arbre et écabossage sans délai.

T7 : Fermentation en caisse des fèves issues des cabosses abîmées naturellement sur arbre et écabossage différé de 10 j.

1- 3- 1- 2- Etude quantitative

La quantification de la microflore fongique totale et des moisissures noires est fonction du type de traitement (Tableau 17). Pour un traitement donné, la teneur en moisissure reste une fonction du stade de prélèvement. L'étape B demeure l'étape qui présente le niveau de contamination le plus élevé à la fois pour les moisissures totales et les *Aspergillus* noirs. L'intégrité de la cabosse et le délai d'écabossage constituent des facteurs déterminants du niveau de contamination. La fermentation des fèves issues des cabosses abîmées naturellement sur l'arbre et d'un écabossage après 10 j (T7) donne les teneurs en moisissures les plus importantes. La concentration maximale en moisissures totales, obtenue après fermentation, est de $1,72 \pm 0,10 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ avec $0,68 \pm 0,36 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ d'*Aspergillus* noirs, *A. carbonarius* représentant 50 %. *Aspergillus niger* agg demeure prépondérant parmi les *Aspergillus* noirs isolés.

Tableau 17: Quantification des moisissures totales et moisissures noires isolées (campagne 2007).

Type de traitement	Stade de prélèvement	Moisissures totales (UFC.g ⁻¹)	Moisissures noires (UFC.g ⁻¹)	<i>A. carbonarius</i> (% par rapport aux <i>A. noirs</i>)
T1''	A	nd	nd	-
	B	4,9 ± 2,11 x 10 ⁶	nd	-
	C	2,3 ± 1,22 x 10 ⁵	0,51 ± 0,10 x 10 ⁵	0
T6	A	2,02 ± 1,3 x 10 ⁴	nd	-
	B	4,77 ± 2,14 x 10 ⁵	0,17 ± 0,27 x 10 ⁵	0
	C	8,98 ± 5,15 x 10 ⁴	2,16 ± 1,11 x 10 ⁴	0
T7	A	15,66 ± 9,23 x 10 ⁵	2,33 ± 1,1 x 10 ⁵	25
	B	1,72 ± 0,10 x 10 ⁸	0,68 ± 0,36 x 10 ⁸	50
	C	8,33 ± 5,11 x 10 ⁵	1,77 ± 0,62 x 10 ⁵	25

A, B, C, T1' sont définis au Tableau 8

T6 et T7 sont définis au Tableau 16

nd = non détectable ; Limite de détection 10 UFC.g⁻¹

1- 3- 2- Etude du taux de contamination des fèves

La contamination des fèves de cacao par les moisissures totales demeure très importante quel que soit le type de traitement (Tableau 18). Lorsque les cabosses sont intactes (T1''), les *Aspergillus* noirs sont retrouvés seulement après le séchage. Par contre, les cabosses abîmées et surtout celles écabossées après 10j, engendrent une contamination beaucoup plus importante en *Aspergillus* noirs. Elle est d'autant plus importante que l'écabossage est différé. *A. niger* agg et *A. carbonarius* sont les deux *Aspergillus* noirs isolés.

Tableau 18 : Taux de contamination par les moisissures totales et les moisissures noires (campagne 2007).

Type de Traitement	Stade de prélèvement	Taux de contamination par moisissures totales	Taux de contamination par <i>Aspergillus</i> noirs
T1''	A	0/6	0/6
	B	6/6	0/6
	C	6/6	1/6
T6	A	6/6	0/6
	B	6/6	2/6
	C	6/6	2/6
T7	A	6/6	4/6
	B	6/6	5/6
	C	6/6	5/6

A, B, C, T1' sont définis au Tableau 8

T6 et T7 sont définis au Tableau 16

1- 3- 3- Microflore fongique de l'environnement

La microflore fongique présente dans l'environnement où se déroulent les fermentations a été étudiée : il s'agit de l'air ambiant, de la surface des cabosses de cacao, des feuilles de bananier utilisées pour couvrir les fèves lors d'une fermentation en tas, de la caisse de fermentation, du sac de jute.

Dans l'air, la microflore fongique est essentiellement constituée des espèces *Botrytis sp*, *Cladosporium sp*, *Penicillium paneum*, *A. niger* agg, *Acremonium sp*, *A. tamarii*, *Mucor sp*, *Geotrichum*, *Rhizopus nigricans*, *A. fumigatus*. *A. niger* agg est la seule espèce potentiellement toxigène isolée.

La surface des cabosses de cacao (cortex) quant à elle est contaminée par les espèces *Acremonium sp*, *Fusarium sp*, *A. fumigatus*, *A. tamarii*, *Penicillium sclerotiorum*, *Mucor sp*, *Geotrichum sp*, *Scopulariopsis sp*, *A. carbonarius*, *A. niger* agg, *Rhizopus nigricans*. *A. carbonarius* et *A. niger* sont les espèces potentiellement toxigènes isolées.

Le matériel utilisé pendant la fermentation, comme les feuilles de bananier, la caisse de fermentation et le sac de jute présentent des niveaux de contamination par les moisissures variables. Les espèces *Acremonium sp*, *Rhizopus nigricans*, *Trichoderma sp*, *Mucor sp* et *Fusarium sp* sont isolées des feuilles de bananier, *Scopulariopsis sp*, *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus niger*, *A. tamarii*, *A. fumigatus*, *Geotrichum candidum*, *Mucor sp* sont isolés de la caisse de fermentation et *Mucor sp*, *Penicillium paneum*, *A. fumigatus*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus nigricans*, *A. tamarii* et *A. niger* agg du sac de jute.

1- 4- Discussion

Les moisissures occupent une place importante dans l'écologie des fèves de cacao pendant la fermentation (Roelofsen, 1958 ; Schawn et Wheals, 2004). Les principales moisissures isolées au cours de ce travail sont *Aspergillus fumigatus*, *A. tamarii*, *A. versicolor*, *A. carbonarius*, *A. niger* agg, *Penicillium sclerotiorum*, *P. paneum*, et *P. crustosum*, *Mucor sp*, *Rhizopus sp*, *Fusarium sp*, *Acremonium*, *Cladosporium* et *Trichoderma sp*. La microflore fongique retrouvée dans l'environnement est assez proche de celle des fermentations. *A. niger* agg est l'espèce traditionnellement productrice d'OTA la plus abondante. *A. carbonarius* est seulement retrouvé sur le cortex du cacao. Nos résultats diffèrent de ceux cités par la littérature pour la microflore fongique associée aux fèves fermentées (Maravalhas, 1966) ou

aux fèves séchées (Buting, 1928 ; Ciferri, 1931 ; Dade, 1928). Dans ces travaux, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus glaucus*, *Mucor spp* et *Penicillium spp* ont été isolés. Maravalhas (1966) a isolé *Penicillium citrinum* dans les fèves fermentées. Selon la littérature, les moisissures associées à la fermentation et au séchage sont différentes. A l'exception d'*Aspergillus fumigatus* et *Mucor sp*, les autres espèces trouvées ne sont pas décrites comme associées au cacao. Il apparaît donc que la biodiversité des souches fongiques présentes lors du traitement du cacao est très fortement liée au contexte géographique, climatique, écologique et humain (pratiques traditionnelles locales et conditions d'hygiène inégalement respectées).

Indépendamment de la campagne cacaoyère, de l'état des cabosses et du type de fermentation, (en caisse ou en tas), une forte augmentation de la flore fongique est observée après la fermentation (stade B). Ceci s'explique par la présence du mucilage sucré qui est très propice au développement des moisissures. Avec la fermentation, il y a compétition entre les différentes espèces en présence et celles à grande vitesse de croissance (*Mucor*, *Rhizopus spp*) parviennent à coloniser au détriment des *Aspergillus* et *Penicillium*. Le séchage contribue par contre à réduire la flore car les espèces sensibles vont disparaître au profit des moisissures du sol et plus généralement de l'environnement qui contaminent au cours du séchage solaire. *Aspergillus niger* agg est retrouvé dans toutes les conditions, de la fève fraîche à la fève fermentée et séchée. La contamination par *Aspergillus carbonarius* est surtout retrouvée au niveau des fèves issues des cabosses abîmées et d'un écabossage différé. Cette forte contamination peut provenir du fait que lorsque les cabosses sont semi-ouvertes, les fèves de cacao sont en contact direct avec l'air et le sol, source possible de *A. carbonarius*. Lorsque les cabosses sont entières, les souches d'*A. carbonarius* pourrait être moins compétitives pour s'implanter, situation qui serait modifiée lorsque les cabosses sont abîmées.

Il est à noter qu'aucune souche d'*A. ochraceus* et *P. verrucosum* n'ont été isolées dans cette étude

2- ETUDE DE LA PRODUCTION D'OCHRATOXINE A

Ces travaux ont été réalisés afin d'étudier l'aptitude des souches isolées pendant les différentes campagnes cacaoyères à produire l'OTA.

La teneur en OTA des échantillons de cacao marchand d'où sont isolés les souches toxigènes a été également dosée afin d'établir une éventuelle relation de cause à effet.

Les milieux de culture utilisés pour étudier la production d'OTA ont été le milieu PDA (Suárez-Quiroz *et al.*, 2005), le milieu officiel préconisé par la FDA : milieu riz (Tournas *et al.*, 2001), et le milieu naturel qui est le cacao (Mat. et Méth., § 4-3).

Le criblage des souches isolées a d'abord été fait sur milieu PDA, puis confirmé sur les milieux Czapeck agar, CYA et MEA (Annexe 3). Seules les souches productrices d'OTA sur ces milieux ont été testées sur milieux riz et cacao. Pour ce qui est des *Aspergillus* noirs, le criblage a porté sur 53, 12 et 10 isolats d'*Aspergillus carbonarius*, respectivement pendant les campagnes cacaoyères 2005, 2006 et 2007. Au cours de ces mêmes campagnes cacaoyères, 145, 53 et 28 isolats d'*A. niger* agg ont été respectivement étudiés. L'étude de la production d'OTA sur milieux riz et cacao n'a été effectuée que sur 2, 2 et 4 isolats d'*Aspergillus carbonarius* et 3, 0 et 0 isolats d'*A. niger* agg. Le choix des souches à étudier a été fait en fonction des différences phénotypiques et au sein d'un même groupe phénotypique, le choix a été fait au hasard.

L'OTA a été quantifiée dans les fèves de cacao marchand résultant des différents traitements technologiques par la méthode de Nakajima *et al.*, (1997).

2- 1- Production d'OTA par les moisissures isolées

La capacité de produire l'OTA a été étudiée sur toutes les espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium* isolées. Il s'agit d'*Aspergillus fumigatus*, *A. tamarii*, *A. versicolor*, *A. carbonarius*, *A. niger* agg, *Penicillium sclerotiorum*, *P. paneum* et *P. crustosum*. Aucune production d'OTA n'a été observée avec *A. tamarii*, *P. sclerotiorum*, *P. paneum*, *P. crustosum*. Il en est de même pour *A. fumigatus*, *A. versicolor* qui sont des espèces parfois citées dans la littérature comme producteurs d'OTA. Seuls *A. carbonarius*, et *A. niger* agg ont

produit l'OTA. Cette production varie avec l'espèce (*A. carbonarius*, et *A. niger* agg), l'isolat et le milieu de culture (riz ou cacao).

Les isolats d'*Aspergillus carbonarius* présentent une forte toxinogénèse qui varie en fonction du milieu de culture. La production d'OTA est plus importante sur milieu riz avec une teneur de $334,8 \pm 1,2$ à $2772,0 \pm 1,7$ ng.g⁻¹ après vingt jours de culture (Tableau 19). Sur milieu cacao des valeurs de $17,1 \pm 0,6$ à $175,9 \pm 1,1$ ng.g⁻¹ et $25,7 \pm 1,2$ à $236,9 \pm 1,1$ ng.g⁻¹ sont obtenues après 8 et 20 j de culture respectivement.

Par rapport à *Aspergillus carbonarius*, les isolats d'*Aspergillus niger* agg présentent une toxinogénèse beaucoup moins importante. Sur milieu riz, la production d'OTA est de 0,03 à 3,6 ng.g⁻¹ contre 0,03 à 0,2ng.g⁻¹ sur milieu cacao après 20 j de culture.

Tableau 19 : Production d'OTA par les moisissures isolées lors des différentes campagnes cacaoyères en fonction du milieu de culture (souches sélectionnées comme étant les plus productrices sur milieu PDA)

Isolats	Production d'OTA (ng.g ⁻¹)		
	Milieu riz (FDA)	Milieu cacao	
		Dosage après 8j	Dosage après 20j
<i>A. carbonarius</i> 14	573,4 ± 1,6	39,2 ± 0,8	50,6 ± 0,9
<i>A. carbonarius</i> 15	2772,0 ± 1,7	84,5 ± 1,3	110,7 ± 1,0
<i>A. carbonarius</i> 38	569,8 ± 1,9	83,42 ± 1,8	171,0 ± 1,1
<i>A. carbonarius</i> 39	337,8 ± 1,5	17,1 ± 0,6	25,7 ± 1,2
<i>A. carbonarius</i> 64	255,1 ± 1,6	91,0 ± 1,0	181,2 ± 1,3
<i>A. carbonarius</i> 65	1210,0 ± 1,0	61,3 ± 0,9	229,3 ± 0,8
<i>A. carbonarius</i> 70	334,8 ± 1,2	175,9 ± 1,1	236,9 ± 1,1
<i>A. carbonarius</i> 71	901,0 ± 1,7	77,8 ± 1,0	196,8 ± 0,7
<i>A. niger</i> 13	nd	0,5 ± 0,0	nd
<i>A. niger</i> 17	3,5 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0
<i>A. niger</i> 24	3,6 ± 0,0	nd	0,05 ± 0,0

nd : non détectable (<0,03 ng.g⁻¹)

Aspergillus carbonarius 14 : Campagne cacaoyère 2005, début de campagne, traitement T4, stade A

Aspergillus carbonarius 15 : Campagne cacaoyère 2005, milieu de campagne, traitement T3, stade C

Aspergillus carbonarius 38 : Campagne cacaoyère 2006, traitement T5³, après 2 mois de stockage

Aspergillus carbonarius 39 : Campagne cacaoyère 2006, traitement T4³, 2 mois de stockage

Aspergillus carbonarius 64 : Campagne cacaoyère 2007, traitement T7, stade A

Aspergillus carbonarius 65 : Campagne cacaoyère 2007, traitement T7, stade B

Aspergillus carbonarius 70 : Campagne cacaoyère 2007, cortex

Aspergillus carbonarius 71 : Campagne cacaoyère 2007, traitement T7, stade C

Aspergillus niger 13 : Campagne cacaoyère 2005, début de campagne, traitement T4, stade A

Aspergillus niger 17 : Campagne cacaoyère 2005, début de campagne, traitement T2, stade B

Aspergillus niger 24 : Campagne cacaoyère 2005, fin de campagne, traitement T4, stade B

2- 2- Teneur en OTA des fèves de cacao

Les Tableaux 20, 21 et 22 donnent les teneurs en OTA, ainsi que la flore toxigène associée aux cacaos marchands issus des campagnes cacaoyères 2005, 2006 et 2007.

Exception faite de l'essai avec inoculation d'une souche non toxigène d'*A. niger* agg (T5), la contamination des fèves par l'OTA est faible après fermentation en caisse et en tas lorsque les fèves sont issues de cabosses intactes, et ceci quelle que soit l'étape de prélèvement. Les teneurs en OTA sont dans ce cas comprises entre nd (non détectable : $< 0,03 \text{ ng.g}^{-1}$) et $0,25 \text{ ng.g}^{-1}$, ce qui reste inférieur à 2 ng.g^{-1} (norme en cours d'élaboration pour les fèves de cacao marchand). La microflore toxigène associée aux fèves contaminées par l'OTA est constituée majoritairement d'*A. niger* agg. Lorsque les cabosses ne sont pas intactes (blessées volontairement ou naturellement), une teneur maximale de $75,5 \text{ ng.g}^{-1}$ est observée, ce qui est très supérieur aux doses tolérables. Les espèces toxigènes associées à ces fèves sont *Aspergillus carbonarius* et *Aspergillus niger* agg.

Le traitement avec inoculation (T5) donne des résultats différents des autres fermentations réalisées à partir des cabosses intactes. La teneur en OTA dosée est beaucoup plus importante après séchage. Une valeur égale à 12 ng.g^{-1} est obtenue. La microflore toxigène associée est dans ce cas uniquement constituée d'*A. niger* agg.

Pendant le stockage du cacao (Tableau 21, point d'échantillonnage C, D et E), les teneurs en OTA des traitements témoins (T1') et des fèves issues des cabosses abîmées (T4') sont comprises entre nd et $0,81 \text{ ng.g}^{-1}$, ceci quelle que soit la durée de stockage. La microflore toxigène associée est *A. niger* agg. Le traitement avec inoculation (T5) donne les teneurs en OTA les plus importantes au cours du stockage. Une teneur maximale de $32,24 \pm 1,06 \text{ ng.g}^{-1}$ est obtenue après 4 mois de stockage avec présence d'*A. carbonarius*..

Tableau 20 : Teneur en OTA dans le cacao marchand issu de la campagne cacaoyère 2005.

	Type de fermentation		OTA des fèves (ng.g ⁻¹)	Principales moisissures associées
Début de campagne	T1	A	nd	/
		B	0,05 ± 0,01	<i>A. versicolor</i> , <i>A. niger</i> agg *
		C	nd	<i>A. tamarii</i>
	T2	A	nd	/
		B	0,04 ± 0,02	<i>A. versicolor</i> , <i>A. niger</i> agg *, <i>A. fumigatus</i> , <i>P. paneum</i>
		C	0,15 ± 0,01	<i>A. tamarii</i>
	T3	A	nd	<i>P. sclerotiorum</i>
		B	0,17 ± 0,04	<i>A. versicolor</i>
		C	0,09 ± 0,01	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. tamarii</i>
	T4	A	12,14 ± 0,10	<i>A. carbonarius</i>** , <i>A. niger</i> agg *
		B	0,41 ± 0,04	<i>A. versicolor</i>
		C	0,16 ± 0,02	<i>A. niger</i> agg *, <i>P. sclerotiorum</i> , <i>P. crustosum</i>
Milieu de campagne	T1	A	nd	/
		B	0,13 ± 0,02	<i>A. niger</i> agg *, <i>P. paneum</i>
		C	0,03 ± 0,00	<i>A. niger</i> agg *, <i>P. paneum</i>
	T2	A	nd	/
		B	nd	<i>A. tamarii</i> , <i>P. paneum</i>
		C	nd	<i>A. niger</i> agg *, <i>A. tamarii</i> , <i>P. paneum</i>
	T3	A	0,03 ± 0,00	<i>A. tamarii</i> , <i>A. niger</i> agg *, <i>P. sclerotiorum</i>
		B	0,25 ± 0,20	<i>A. tamarii</i> , <i>A. niger</i> agg *, <i>P. paneum</i>
		C	0,05 ± 0,00	<i>A. niger</i> agg *
	T4	A	22,20 ± 0,91	<i>A. carbonarius</i>** , <i>A. niger</i> agg *, <i>P. paneum</i>
		B	1,14 ± 0,07	<i>A. niger</i> agg *, <i>A. tamarii</i>
		C	1,01 ± 0,02	<i>A. niger</i> agg *
Fin de campagne	T1	A	nd	/
		B	0,06 ± 0,01	<i>A. niger</i> agg *, <i>P. paneum</i>
		C	0,12 ± 0,01	<i>A. niger</i> agg *
	T2	A	nd	/
		B	0,27 ± 0,01	<i>A. niger</i> agg *, <i>P. paneum</i> , <i>A. tamarii</i>
		C	0,06 ± 0,00	<i>A. niger</i> agg *, <i>P. paneum</i>
	T3	A	0,08 ± 0,01	<i>A. niger</i> agg *, <i>P. paneum</i>
		B	nd	<i>P. paneum</i>
		C	0,06 ± 0,03	<i>A. niger</i> agg *, <i>A. tamarii</i>
	T4	A	48,01 ± 0,75	<i>A. niger</i> agg *, <i>A. carbonarius</i> **, <i>P. crustosum</i>
		B	4,18 ± 0,24	<i>A. niger</i> agg *, <i>P. crustosum</i>
		C	5,40 ± 0,41	<i>A. niger</i> agg *

* : toxigène

** : très toxigène

A, B, C et T1-T4 sont définis au Tableau 8

nd : non détectable ; Limite de détection < 0,03 ng.g⁻¹

Tableau 21 : Teneur en OTA dans le cacao marchand issu de la campagne cacaoyère 2006.

Type de traitement	OTA des fèves (ng.g ⁻¹)	Principales moisissures associées
T1'	A	nd
	B	nd
	C	0,05 ± 0,00
	D	nd
	E	0,34 ± 0,07
T4'	A	nd
	B	nd
	C	0,15 ± 0,01
	D	nd
T5	E	0,81 ± 0,01
	A	nd
	B	nd
	C	12,0 ± 0,01
	D	4,15 ± 0,19
	E	32,24 ± 1,06

* : toxinogène

** : très toxinogène

A, B, C et T1', T4' sont définis au Tableau 8

T5 est défini au Tableau 12

C= 0 mois de stockage

D= fèves stockées pendant 2 mois

E= fèves stockées pendant 4 mois

nd : non détectable ; Limite de détection < 0,03 ng.g⁻¹

Tableau 22 : Teneur en OTA dans le cacao marchand issu de la campagne cacaoyère 2007.

Type de traitement	OTA des fèves (ng.g ⁻¹)	Principales moisissures associées
T1''	A	nd
	B	0,04 ± 0,00
	C	nd
T6	A	0,08 ± 0,01
	B	0,05 ± 0,00
	C	0,98 ± 0,11
T7	A	75,49 ± 1,09
	B	26,29 ± 0,98
	C	20,75 ± 1,22

* : toxinogène

** : très toxinogène

A, B, C, T1' sont définis au Tableau 8

T6 et T7 sont définis au Tableau 16

nd : non détectable ; Limite de détection < 0,03 ng.g⁻¹

2- 3- Discussion

L'étude de la production d'OTA par les moisissures isolées sur cacao montre que *Aspergillus fumigatus*, *A. tamarii*, *A. versicolor*, *Penicillium sclerotiorum*, *P. paneum*, et *P. crustosum* ne produisent pas l'OTA. Contrairement à nos résultats, la littérature indique qu'*Aspergillus fumigatus*, et *A. versicolor* peuvent produire de l'OTA dans les céréales (Rizzo *et al.*, 2002). *Penicillium sclerotiorum* a également été cité comme producteur d'OTA (Frisvad *et al.*, 2004). Il est probable qu'il existe des différences entre souches d'origines différentes avec une incidence du substrat.

Nos résultats montrent que seuls les *Aspergillus carbonarius* (100 %) et quelques souches d'*A. niger* agg (8 %) sont aptes à produire l'OTA dans le cacao. Quel que soit le milieu de culture, les isolats d'*Aspergillus carbonarius* sont beaucoup plus toxigènes que ceux des *A. niger* agg. Comme dans le raisin (Belli *et al.*, 2006), *Aspergillus carbonarius* est la principale souche productrice d'OTA dans le cacao. Taniwaki *et al.* (2003) ont montré sur le café que 75 % d'*Aspergillus ochraceus* et 3 % d'*A. niger* agg produisent l'OTA. Sur le cacao, Amézqueta *et al.* (2008), ont trouvé que tous les isolats d'*A. carbonarius* produisent l'OTA tandis qu'aucun isolat d'*A. niger* agg isolé n'était ochratoxinogène. La proportion d'*A. niger* agg producteurs semble donc différente en fonction du contexte. Les souches toxigènes isolées au cours de ce travail montrent des productions d'OTA sur milieu PDA allant de 334,8 à 2772,0 ng.g⁻¹ pour *A. carbonarius* et moins de 0,03 à 3,6 ng.g⁻¹ pour *A. niger* agg. Dans la littérature, des teneurs plus importantes peuvent être relevées. Chez *A. carbonarius*, Amézqueta *et al.* (2008) ont trouvé une teneur maximale de 3520 ng.g⁻¹ tandis que Suárez-Quiroz *et al.* (2004 b) obtiennent une production maximale d'OTA de 114 ng.g⁻¹ chez *A. niger* agg.

La production d'OTA varie selon le substrat : elle est plus importante sur milieu riz que sur milieu cacao (sans tenir compte des teneurs en eau qui sont de 28 et 87 % respectivement pour les milieux riz et cacao respectivement). La nature du substrat semble donc avoir une incidence sur la production de l'OTA, car compte tenu des différentes teneurs en eau, l'effet contraire était attendu. Nos résultats concordent avec ceux des autres auteurs qui relèvent l'influence du substrat sur la production des mycotoxines (Kokkomen *et al.*, 2005 ; Suárez-Quiroz *et al.*, 2005).

Les cabosses abîmées (naturellement ou non) engendrent le cacao le plus contaminé par l'OTA. Nos résultats concordent avec ceux de Bastide *et al.*, (2006) qui montrent que la

présence de l'OTA pendant le traitement post-récolte du cacao est fonction de l'état de la cabosse et des conditions climatiques au moment de la récolte et de la transformation. Selon ces mêmes auteurs, en fonction de l'état phytosanitaire des cabosses, la teneur en OTA des fèves est de $4,2 \text{ ng.g}^{-1}$ pour les cabosses endommagées par les insectes, $19,8 \text{ ng.g}^{-1}$ pour les cabosses blessées, $3,4 \text{ ng.g}^{-1}$ pour les cabosses momifiées.

Lors du traitement T5, l'inoculation avant fermentation des fèves par une suspension de spores d'un *A. niger* agg non producteur d'OTA a été faite avec l'objectif de suivre la souche introduite et de voir également si elle pouvait coloniser prioritairement les fèves et ainsi freiner, voire empêcher la croissance des espèces productrices d'OTA. L'effet de lutte biologique attendu n'a pas été concluant : l'effet est même contraire à celui espéré car les souches productrices d'OTA et de l'OTA ont été détectés à un niveau supérieur dans les échantillons de cacao issus de ce traitement. La souche inoculée d'*A. niger* agg ne présente ainsi aucun antagonisme direct vis-à-vis d'*A. carbonarius* et son inoculation précoce favoriserait même l'activité ochratoxinogène des souches potentiellement productrices. Même si la teneur en moisissures obtenue après la fermentation permet à priori de penser que l'inoculum s'est bien implanté, seule l'étude moléculaire permettra de le confirmer.

Pendant les traitements technologiques, il est possible d'établir une certaine relation entre la teneur en OTA des fèves et la microflore toxigène associée car *A. carbonarius* est la microflore toxigène associée aux fèves présentant les plus fortes teneurs en OTA.

Au cours du stockage, les traitements T1' et T4' ne présentent pas une forte contamination par l'OTA. Par contre, le traitement avec inoculation engendre le cacao le plus contaminé. Les souches ochratoxinogènes retrouvées sont parfois uniquement des *A. niger* agg qui ont une production d'OTA très limitée ou encore des *A. carbonarius* plus toxigènes. Des résultats similaires ont été obtenus par Amézqueta (2007) sur 20 échantillons de cacao stockés, d'origine diverse. Au cours du stockage, la teneur en OTA des cacaos marchands ne peut pas toujours être mise en relation avec la présence des souches ochratoxinogènes. Bien que les facteurs qui influencent le développement fongique doivent être pris en compte, il convient de souligner que la présence de moisissures n'implique pas forcément la synthèse de l'OTA. A l'inverse, il est possible de détecter la mycotoxine en l'absence de la moisissure productrice. Les formes végétatives et germinatives de la moisissure peuvent être inactivées par les processus chimiques ou environnementaux, alors que l'OTA, plus stable, est demeurée inaltérée dans le substrat (Gimeno, 2000).

Il est connu (Esteban *et al.*, 2006) que les conditions de séchage et de stockage jouent un grand rôle sur la présence d'OTA. Nos résultats montrent que la contamination qui intervient avant les traitements post-récolte a également une influence sur la qualité finale : un bon état des cabosses et un écabossage sans délai permettent en effet de réduire en partie les risques. Il est également nécessaire de réduire au maximum la période de transit du cacao marchand vers l'Europe afin de limiter la contamination par l'OTA pendant le stockage.

3- INCIDENCE DES FACTEURS CHIMIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX SUR LA CROISSANCE ET LA PRODUCTION DE L'OCHRATOXINE A DANS LE CACAO

La formation de l'OTA et des autres mycotoxines dépend de l'interaction complexe de plusieurs facteurs. Sur les grains et les fruits, les facteurs les plus importants sur la croissance et la toxinogénèse sont la température, et l'humidité (Lai *et al.*, 1970 ; Marquardt et Frohlich, 1992 ; Axberg *et al.*, 1997 ; Stander *et al.*, 2000 b ; Suaréz-Quiroz *et al.*, 2004 ; Kokkonen *et al.*, 2005). D'autres facteurs, également importants sur la croissance et la toxinogénèse des moisissures, sont la composition du milieu (micronutriments et alcaloïdes), la présence des agents concurrents (Lee et Magan, 1999 ; Elmholt et Hestbjerg, 1999), le pH (Aziz et Moussa, 1997 ; Esteban *et al.*, 2006), l'action des insectes (qui brisent l'écorce qui protège les grains), le stress des plantes, le temps de culture, la teneur en O₂ et CO₂, les traitements physiques et chimiques, la vitesse de séchage et de réhydratation des grains pendant le stockage (Chelack *et al.*, 1991 ; Gimeno, 2000 ; Eskola, 2002 ; Atalla *et al.*, 2003 ; Magan *et al.*, 2003).

L'étude des conditions de croissance et de production d'OTA par plusieurs souches fongiques ochratoxinogènes isolées du café (Cabrera *et al.*, 2001 ; Taniwaki *et al.*, 2001 ; Suàrez-Quiroz, 2004), du raisin (Belli, 2004 ; Mitchell, 2004 ; Pardo, 2005), des céréales (Lee and Magan, 2000 ; Pardo *et al.*, 2004) et plus particulièrement de l'orge (Ribeiro *et al.*, 2006) ont été décrites. Il n'existe pas des travaux sur les moisissures isolées de la matrice cacao.

Les travaux présentés ici ont consisté à étudier, en milieu modèle, l'influence de l'activité de l'eau (A_w) et de certains alcaloïdes naturellement présents dans le cacao (caféine, théobromine) et de l'épicatéchine sur la croissance et la toxinogénèse chez les souches d'*A. niger* agg et *A. carbonarius* isolées lors des différentes campagnes cacaoyères.

3- 1- Influence de l'activité de l'eau sur la croissance et la toxinogénèse

L'impact de l' A_w sur la croissance et la production d'OTA a été étudié sur un isolat d'*A. niger* agg et 5 isolats d'*A. carbonarius*.

- *A. niger* agg 13 isolé des fèves non fermentées issues des cabosses blessées (T4) de la campagne cacaoyère 2005

- *A. carbonarius* 14 isolé du stade A (fèves non fermentées) du traitement T4 de la campagne cacaoyère 2005
- *A. carbonarius* 15 isolé après le séchage des fèves issues des cabosses entières et d'un écabossage différé de 10j (T3) de la campagne cacaoyère 2005
- *A. carbonarius* 38 et 39 isolés après 2 mois de stockage des fèves issues de T4' de la campagne cacaoyère 2006
- *A. carbonarius* 70 isolé du cortex de cacao pendant la campagne cacaoyère 2007.

Il est à noter que le choix des souches a été fait en fonction des différences phénotypiques, et à l'intérieur d'un même groupe, les plus productrices ont été choisies.

Les intervalles d'étude sont fixés en fonction des conditions réelles du traitement post-récolte et du stockage du cacao. Sept niveaux d' A_w (0,7 ; 0,75 ; 0,8 ; 0,85 ; 0,9 ; 0,95 ; 0,99) et quatre durées d'incubation (6, 12, 18, 24 jours) sont étudiés. La croissance apicale est mesurée.

3- 1- 1- *Aspergillus niger* agg

Les Figures 22 a et b donnent l'évolution de la croissance apicale et de la toxinogénèse en fonction de l'activité de l'eau et de la durée d'incubation.

Quelle que soit l' A_w , *A. niger* agg 13 débute sa croissance avant 6 jours de culture. Les niveaux d' A_w donnant une meilleure croissance sont : 0,90 ; 0,95 et 0,99. L'optimum de croissance est obtenu dès 12 j de culture lorsque l' A_w est de 0,95 à 0,99.

Les A_w donnant une meilleure toxinogénèse chez *A. niger* agg 13 sont : 0,85 ; 0,90 ; 0,95 et 0,99. L'optimum est obtenu à des valeurs allant de 0,95 à 0,99.

Contrairement à la croissance, la toxinogénèse chez *A. niger* agg 13 est très dépendante de l' A_w du milieu de culture. Pour des A_w inférieures ou égale à 0,80, aucune activité ochratoxigénique n'est observée quelle que soit la durée de culture. Elle ne débute qu'à partir de 85 % d' A_w et cesse au bout de 18 j.

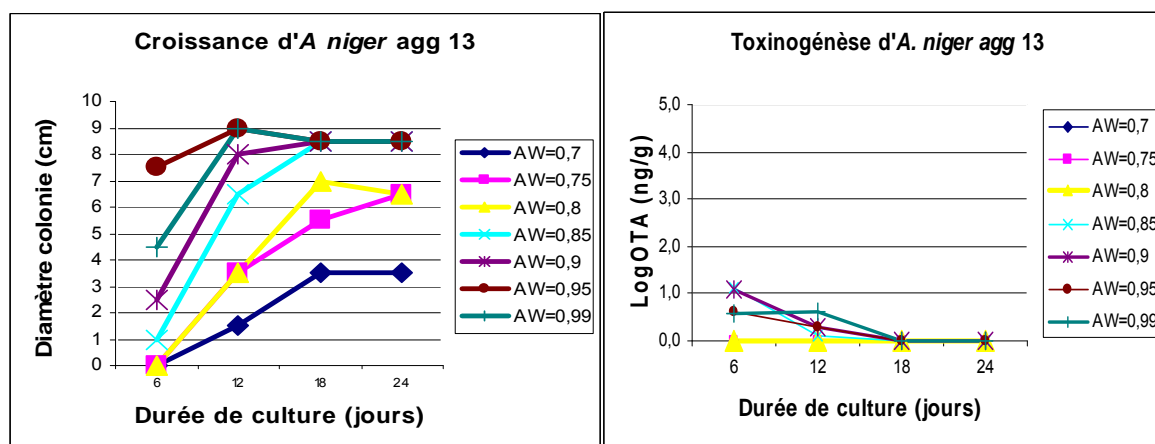


Figure 22a : Croissance d'*A. niger* agg 13 en fonction de l' A_w et de la durée d'incubation

Figure 22b : Toxinogénèse d'*A. niger* agg 13 en fonction de l' A_w et de la durée d'incubation

NB : la production d'OTA est en valeur logarithmique car les teneurs en OTA obtenues sont très dispersées.

3- 1- 2- *Aspergillus carbonarius*

Les Figures 23 a et b, 24 a et b, 25 a et b donnent l'évolution de la croissance et de la toxinogénèse en fonction de l'activité de l'eau chez 3 souches d'*A. carbonarius* (14, 15 et 38).

Comme pour *A. niger* agg, la croissance d'*A. carbonarius* est peu dépendante de l' A_w du milieu ambiant. Elle débute avant 6 jours de culture. Quelle que soit la souche d'*A. carbonarius*, les niveaux d' A_w donnant une meilleure croissance sont : 0,90 ; 0,95 et 0,99.

Par contre, la toxinogénèse chez *A. carbonarius* est très dépendante de l' A_w du milieu. Elle est également fonction de la souche étudiée. Dans tous les cas, l'optimum de production est obtenu à des A_w de 0,95 – 0,99.

Les conditions d'activité de l'eau pour la production d'OTA par *A. carbonarius* 14 sont plus limitées que celles nécessaires à son développement. L' A_w critique de production d'OTA est de 0,85. Aucune activité ochratoxigénique n'est observée à des niveaux inférieurs à 0,85 quelle que soit la durée d'incubation. Le maximum de production d'OTA est obtenu après 12 jours de culture lorsque l' A_w est de 0,99. L' A_w donnant une meilleure toxinogénèse chez *A. carbonarius* 14 est 0,99.

A. carbonarius 15 et 38 présentent des cinétiques de production d'OTA semblables. L' A_w n'est plus un facteur limitant pour la toxinogénèse car une production d'OTA est observée pour toute valeur d' A_w . Pour des valeurs allant de 0,95 à 0,99, la production d'OTA est plus

importante et débute dès 6j de culture. Tandis qu'avec des valeurs plus faibles d' A_w (0,70 ; 0,75 ; 0,80 ; 0,85 et 0,90) la production d'OTA ne sera observée qu'après 12 j.

Des résultats similaires sont obtenus avec les *A. carbonarius* 39 et 70 (Annexe 4).

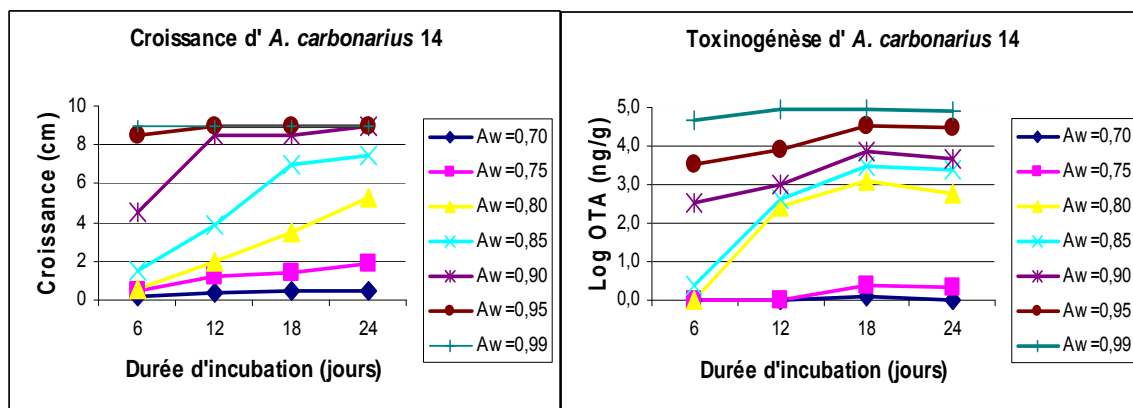


Figure 23a : Croissance d'*A. carbonarius* 14 en fonction de l' A_w et de la durée d'incubation

Figure 23b : Toxinogénèse d'*A. carbonarius* 14 en fonction de l' A_w et de la durée d'incubation

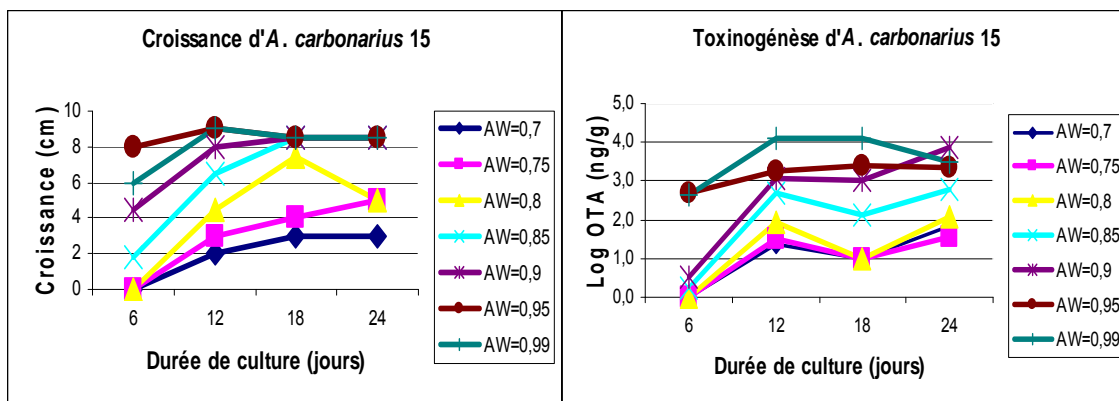


Figure 24a : Croissance d'*A. carbonarius* 15 en fonction de l' A_w et de la durée d'incubation

Figure 24b : Toxinogénèse d'*A. carbonarius* 15 en fonction de l' A_w et de la durée d'incubation

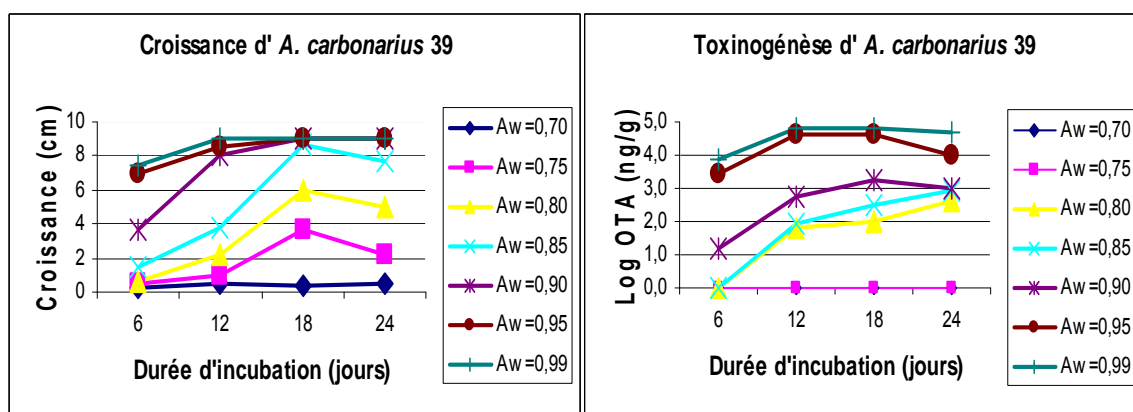


Figure 25a : Croissance d'*A. carbonarius* 38 en fonction de l' A_w et de la durée d'incubation

Figure 25b : Toxinogénèse d'*A. carbonarius* 38 en fonction de l' A_w et de la durée d'incubation

3- 2- Influence de certains alcaloïdes et de l'épicatéchine sur la croissance et la toxinogénèse

L'action directe de la caféine, la théobromine et l'épicatéchine sur la croissance et la toxinogénèse de certaines souches toxigènes est étudiée après 7 j de culture sur milieu PDA. Dans les fèves de cacao de type Forastero Amazonien, les teneurs en caféine et théobromine sont respectivement de 1,3 et 36,2 mg/g (Timbie *et al.*, 1978). La teneur en épicatéchine par contre est fonction du degré de fermentation. Elle va de 1 % (p/p) avant fermentation à 0,2 % (p/p) après la fermentation. L'étude porte sur une souche d'*A. niger* agg et 2 d'*A. carbonarius*.

- *A. niger* agg 13 isolé sur les fèves non fermentées issues des cabosses blessées (T4) de la campagne 2005
- *A. carbonarius* 14 isolé du stade A (fèves non fermentées) du traitement T4 de la même campagne cacaoyère
- *A. carbonarius* 15 isolé après le séchage des fèves issues de la fermentation en tas des fèves issues des cabosses entières et d'un écabossage différé de 10 j lors de la campagne cacaoyère 2005.

Les souches étudiées sont choisies en fonction du niveau de production d'OTA.

Les concentrations testées sont 0 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; et 2,5 mg/g pour la caféine et la théobromine, 0 et 3,5 mg/g pour l'épicatéchine.

3- 2- 1- Caféine

Les Figure 26 et 27 (a et b) donnent l'évolution de la croissance et la toxinogénèse en fonction de la teneur en caféine du milieu chez *A. niger* agg 13 et des *A. carbonarius* 14 et 15.

La caféine a une activité antifongique limitée chez *A. niger* agg, ce qui n'est pas le cas chez les souches d'*A. carbonarius* où l'on note une baisse graduelle de la croissance dès la concentration d'1 mg/g.

La toxinogénèse d'*A. niger* agg et d'*A. carbonarius* est influencée par la teneur en caféine du milieu de culture. Chez *A. niger* agg, la baisse de la production d'OTA devient sensible lorsque la teneur en caféine est de 2 mg/g. Elle est beaucoup plus prononcée chez *A. carbonarius* où on note une baisse d'activité dès 1 mg/g. *A. carbonarius* 14 présente une sensibilité plus importante à la caféine que *A. carbonarius* 15 car aucune production d'OTA n'est observée à plus de 2 mg/g de caféine dans le milieu de culture. Par rapport au témoin, aucune variation sensible de la production d'OTA n'est obtenue avec *A. niger* agg au voisinage de la teneur réelle en caféine dans les fèves de cacao Forastero Amazonien (1,3 mg/g).

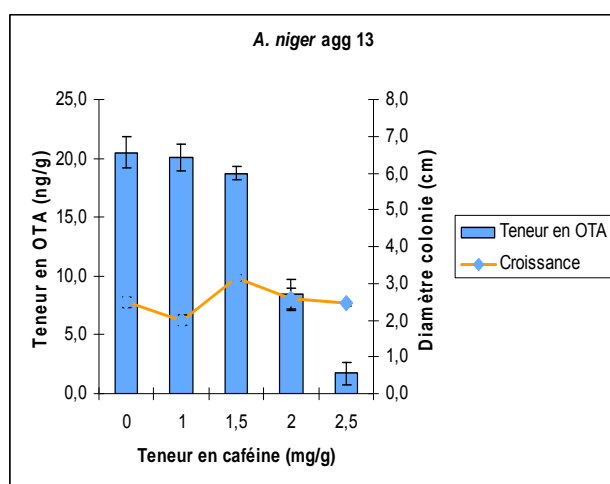


Figure 26 : Croissance et toxinogénèse d'*A. niger* 13 en fonction de la teneur en caféine du

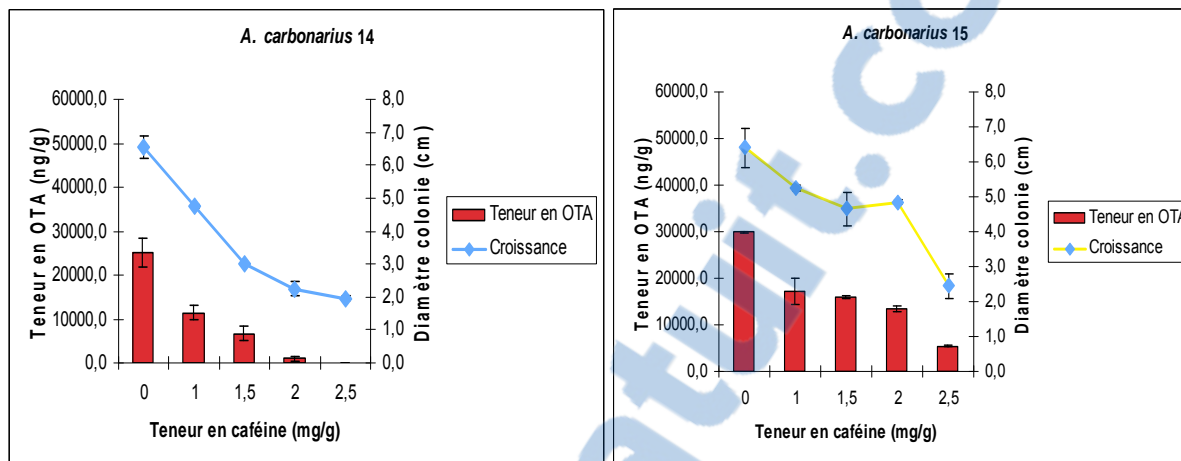


Figure 27a : Croissance et toxinogénèse d'*A. carbonarius* 14 en fonction de la teneur en caféine du milieu.

Figure 27b : Croissance et toxinogénèse d'*A. carbonarius* 15 en fonction de la teneur en caféine du milieu.

3- 2- 2- Théobromine et épicatechine

La théobromine (Figure 28, 29 a et b) et l'épicatechine (Figure 30, 31 a et b) ont une activité antifongique limitée chez *A. niger* agg et *A. carbonarius*. Par rapport au témoin, la croissance de ces espèces varie peu quelle que soit la concentration en alcaloïde (théobromine et épicatechine) du milieu.

Comme la croissance, la teneur en théobromine ou en épicatechine du milieu n'influence pas de façon sensible la production d'OTA, ceci quelle que soit la concentration. *A. carbonarius* 14 et un peu plus sensible à la teneur en épicatechine que *A. carbonarius* 15. Au voisinage de la teneur réelle en théobromine et en épicatechine des fèves de cacao marchand de type Forastero Amazonien, la production d'OTA obtenue reste peu différente de celle obtenue avec le témoin.

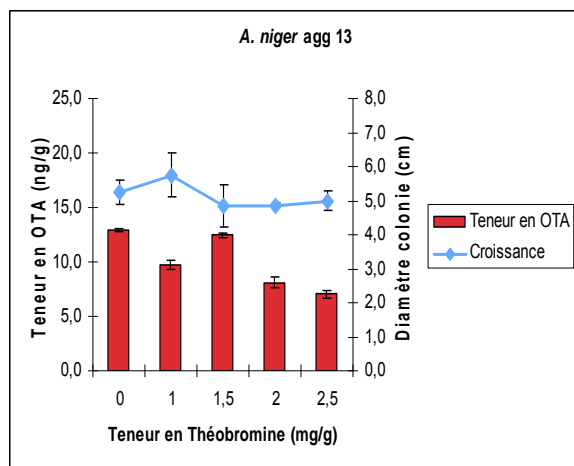


Figure 28 : Croissance et toxinogénèse d'*A. niger* agg 13 en fonction de la teneur en théobromine du milieu.

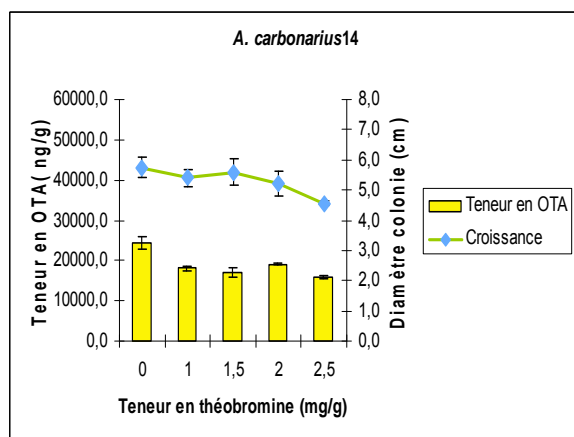


Figure 29a : Croissance et toxinogénèse d'*A. carbonarius* 14 en fonction de la teneur en théobromine du milieu.

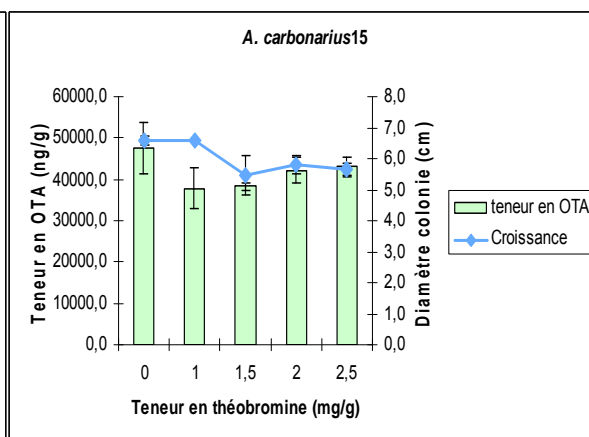


Figure 29b : Croissance et toxinogénèse d'*A. carbonarius* 15 en fonction de la teneur en théobromine du milieu.

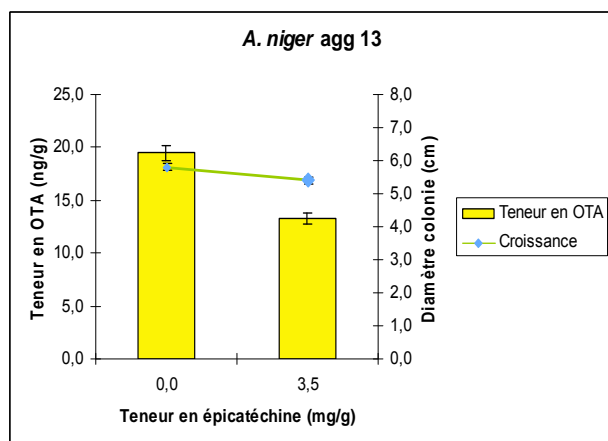


Figure 30 : Croissance et toxinogénèse d'*A. niger* 13 en fonction de la teneur en épicatechine du milieu.

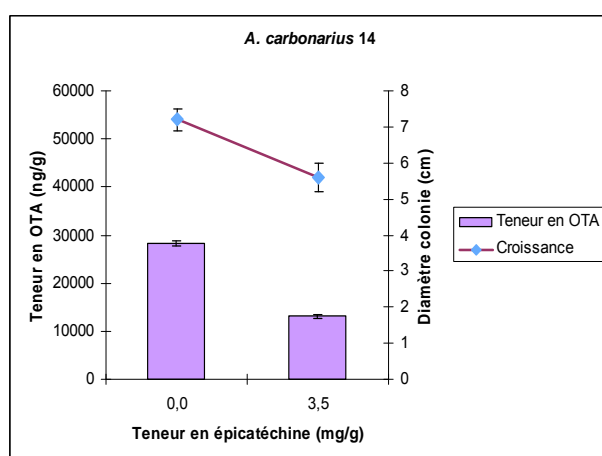


Figure 31a : Croissance et toxinogénèse d'*A. carbonarius* 14 en fonction de la teneur en épicatechine du milieu.

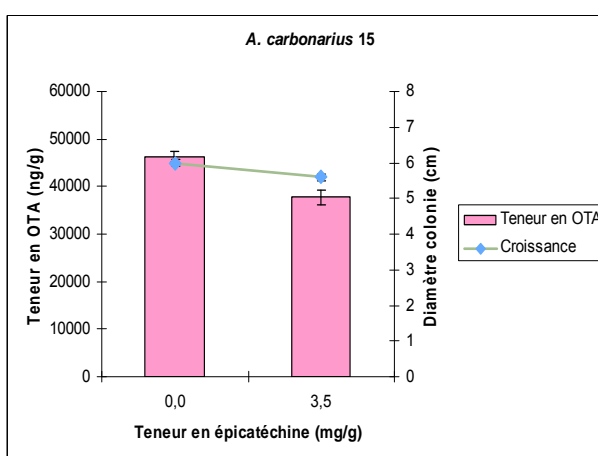


Figure 31b : Croissance et toxinogénèse d'*A. carbonarius* 15 en fonction de la teneur en épicatechine du milieu.

3- 3- Discussion

Nos travaux montrent qu'à 25°C, la croissance des souches d'*A. niger* agg ou d'*A. carbonarius* étudiées n'est pas influencée par l' A_w du milieu de culture, ceci quelle que soit la durée d'incubation. L'optimum de croissance est compris entre 0,95 et 0,99 chez *A. niger* agg et 0,90 et 0,99 chez *A. carbonarius*. Plusieurs auteurs (Belli *et al.*, 2004 ; Esteban *et al.*, 2004, Mitchell *et al.*, 2004 ; Pardo *et al.*, 2005) ont aussi étudié les conditions de croissance chez *A. niger* agg et *A. carbonarius*, ceci sur une plage de température allant de 6 à 47°C. L' A_w minimale était de 0,77 et 0,82 respectivement chez *A. niger* agg. et *A. carbonarius*. L'optimum de croissance est obtenu lorsque l' A_w du milieu était de 0,95 à 0,99 chez *A. niger* agg et 0,93 à 0,987 chez *A. carbonarius* (Tableau 23).

Contrairement à la croissance, la toxinogénèse chez *A. niger* agg et *A. carbonarius* est beaucoup plus dépendante de l' A_w du milieu de culture. L'optimum de production d'OTA est obtenu à 0,99 d' A_w chez *A. niger* agg et de 0,95 à 0,99 d' A_w chez *A. carbonarius*. Des résultats similaires sont obtenus avec *A. niger* agg et *A. carbonarius* isolés du raisin (Esteban *et al.*, 2004 ; Belli *et al.*, 2004 ; Mitchell *et al.*, 2004 ; Pardo *et al.*, 2005), *A. ochraceus* isolé du raisin, céréales et café (Marquardt et Frohlich, 1992 ; Pitt *et al.*, 2002 ; Suárez-Quiroz *et al.*, 2004 ; Pardo *et al.*, 2005) et *P. verrucosum* isolé des céréales (Marquardt et Frohlich, 1992 ; Pitt et Hocking, 1997 ; Pitt *et al.*, 2000) (Tableau 23).

Il est à noter que pendant le séchage solaire, l' A_w des fèves de cacao est de 0,85 – 0,99 pendant 5 - 7 j, dont 2 - 4 j à 0,95. Il y a donc nécessité de réduire au minimum cette période critique afin de limiter les risques de contamination par l'OTA.

L'influence du milieu de culture sur la production d'OTA, relevée entre les milieux riz et cacao (maximum de production 2772 contre 236,9 ng.g⁻¹), est d'autant plus remarquable que le milieu riz contient 3 fois moins d'eau que le milieu cacao.

Tableau 23 : Conditions de développement et de production d'OTA chez quelques moisissures productrices d'OTA.

Espèces	Développement fongique		Matrice	Production d'OTA	
	T (°C)	A_w minimale		T (°C)	A_w minimale
<i>A. carbonarius</i>	10-40	0,82	Raisin	15-35	0,90
	[32-35]	[0,93-0,987]		[20]	[0,95-0,98]
<i>A. niger</i> agg	6-47	0,77	Raisin	10-35	0,90-0,95
	[35-37]	[0,95-0,995]		[25]	[0,98-0,995]
<i>A. ochraceus</i>	8-37 [24-31]	0,80 [0,95-0,99]	Céréale	12-37	0,83
				[27]	[0,95-0,99]
			Café	10-35	0,90
				[35]	[0,95]
			Raisin	20-30	0,80
				[30]	[0,90-1,00]
<i>P. verrucosum</i>	0-31	0,80	Céréale	4-31	0,86
	[20]	[0,95-0,99]		[20]	[0,95-0,99]

Sources : Marquardt et Frohlich, 1992 ; Pitt et Hocking, 1997 ; Pitt *et al.*, 2000 ; Belli *et al.*, 2004 ; Esteban *et al.*, 2004, Mitchell *et al.*, 2004 ; Suárez-Quiroz *et al.*, 2004 ; Pardo *et al.*, 2005.

[...] : Conditions optimales

Les principaux alcaloïdes du cacao (caféine, théobromine) ainsi que l'épicatechine ont des actions variables sur la croissance et la toxinogénèse chez *A. carbonarius* et *A. niger* agg. Contrairement à la théobromine et l'épicatechine, l'influence de la caféine sur la croissance et la toxinogénèse est bien marquée.

Des études similaires ont été faites avec certains constituants du café : caféine et acide chlorogénique (Buchana *et al.*, 1981 ; Soliman, 2002 ; Suárez-Quiroz *et al.*, 2004). Suárez-Quiroz *et al.* (2004) montrent que la caféine inhibe la croissance et la toxinogénèse chez *A. ochraceus*. Lorsque la teneur en caféine est de $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$, la production d'OTA est presque nulle. Les acides chlorogéniques ont un effet peu sensible sur la vitesse de croissance d'*A. ochraceus*. Par contre son action inhibitrice sur la toxinogénèse est beaucoup plus importante car aucune production d'OTA n'est obtenue lorsque la teneur en acides chlorogéniques du milieu est de $0,08 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Toutefois, il est difficile d'utiliser la caféine pour limiter les risques de contamination du cacao par l'OTA car la dose expérimentale où la production d'OTA est inhibée ($2,5 \text{ mg.g}^{-1}$) est bien supérieure à la teneur réelle dans les fèves de cacao de type Forastero Amazonien ($1,3 \text{ mg.g}^{-1}$).

4- ETUDE DE LA BIODIVERSITE DES ASPERGILLUS NOIRS

De nombreuses études identifient les *Aspergillus* noirs comme étant responsables de plusieurs pertes post-récolte importantes des fruits (tomate, melon, pomme, raisin, citron...) ou des tubercules (igname, ail, oignon). Leur habitat de prédilection est le sol mais les *Aspergillus* noirs peuvent également être isolés des fruits secs, des noix, voire de substrats très variés (Kozakiewicz, 1989 ; Abarca *et al.*, 2004 ; Samson *et al.*, 2004).

Dans le cadre du projet européen « Wine-Ochra Risk », une enquête portant sur 107 vignobles dans plusieurs pays de l'Union Européenne a permis d'étudier la biodiversité des *Aspergillus* noirs isolés du raisin, notamment les souches productrices de l'OTA (Bau *et al.*, 2006 ; Perrone *et al.*, 2006a et 2006b). Il n'existe cependant pas de données sur la biodiversité des *Aspergillus* noirs isolés du cacao.

Le but de ce travail est d'étudier la biodiversité des *Aspergillus* noirs isolés pendant les différents traitements technologiques du cacao (ainsi que les relations pouvant exister entre le phénotype et le génotype). L'objectif est également de voir si les différents profils génomiques obtenus peuvent être reliés à la production d'OTA, à l'année de la campagne cacaoyère (2005, 2006, 2007), au type de traitement subi (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7), ou au degré de transformation de la fève (A, B, C, D, E, F).

4- 1- Etude phénotypique et choix des souches

Un total de 301 souches d'*Aspergillus* noirs a été isolé au cours des différentes étapes des traitements technologiques. Afin de choisir les souches qui seront étudiées en biologie moléculaire, des groupes phénotypiques ont été constitués à partir des critères morphologiques. Au sein d'un groupe phénotypique le nombre de souches retenues est fonction du nombre d'individus qui le composent.

4-1-1- *Aspergillus niger* aggregate

Huit groupes phénotypiques ont été définis parmi les souches appartenant au groupe *A. niger* agg sur la base de la croissance sur milieu PDA (Tableau 24) et 39 isolats retenus pour l'étude moléculaire (identification et biodiversité). Les codes associés aux souches retenues sont donnés dans le Tableau 25.

Tableau 24: Les différents groupes phénotypiques chez *A. niger* agg sur milieu PDA

Groupe Phéno- typique (N)	Nombre d'isolats Pour l'étude génotypique	Couleur envers de la colonie	Couleur endroit de la colonie	Densité des colonies	Présence des stries rayon- nantes	Colonie concentrique	
						Contour régulier	Contour irrégulier
I (95)	13	Crème	Crème	+	±	-	-
II (53)	6	Crème	Crème	+	-	+	-
III (7)	3	Incolore	Crème	+	±	+	-
IV (5)	3	Blanc	Crème	+	±	+	-
V (46)	5	Incolore	Jaune	+	±	+	-
VI (1)	1	Incolore	Jaune	+	+	+	-
VII (10)	4	Incolore	Jaune	+	-	-	+
VIII (9)	4	Jaune +	Crème	-	-	+	-

Tableau 25 : Souches d'*A. niger* agg associées aux groupes phénotypiques sur milieu PDA.

Groupes phénotypiques	Codes des souches d' <i>A. niger</i> agg associées
I	13, 18, 27, 37, 42, 46, 49, 50, 57, 30, 32, 33, 34
II	17, 20, 22, 24, 35, 56
III	52, 59, 61
IV	25, 28, 29
V	54, 55, 58, 63, 69
VI	60
VII	62, 66, 67, 68
VIII	26, 40, 45, 31

4- 1- 2- *Aspergillus carbonarius*

Trois groupes phénotypiques ont été définis dans le groupe des souches d'*A. carbonarius* (Tableau 26). L'étude moléculaire portera sur 9 *A. carbonarius* dont les codes associés sont fournis dans le Tableau 27.

Tableau 26: Les différents groupes phénotypiques chez *A. carbonarius* sur milieu PDA.

Groupe Phéno- typique (N)	Nombre d'isolats pour l'étude génotypique	Couleur envers de la colonie	Couleur endroit de la colonie	Densité des colonies	Présence des stries rayon- nantes	Colonie concentrique	
						Contour régulier	Contour irrégulier
I (39)	4	Crème	Crème	+	+	+	-
II (35)	4	Incolore	Jaune	+	+	+	-
III (1)	1	Incolore	Crème	++	++	-	-

Tableau 27 : Souches d'*A. carbonarius* associées aux groupes phénotypiques sur milieu PDA.

Groupes phénotypiques	Codes des souches d' <i>A. carbonarius</i> associées
I	14, 21, 39, 71
II	15, 64, 65, 70
III	38

Le Tableau 28 résume l'origine des souches d'*A. niger* agg et d'*A. carbonarius* qui sont étudiées en biologie moléculaire.

Tableau 28 : Origine des souches d'*A. niger* agg et *A. carbonarius* étudiées

Campagne cacaoyère	Type de traitement	Stade de prélèvement	Groupes phénotypiques et souches associées	
			<i>A. niger</i> agg	<i>A. carbonarius</i>
2005	T1	C	I (18), II (20), III (52)	
2005	T2	B	II (17)	
		C		I (21)
2005	T3	C		II (15)
2005	T4	A	I (13)	I (14)
		B	II (22, 24), I (50)	
2006	T1'	C	IV (29), II (56), I (57)	
		D	I (37)	
		E	I (49)	
2006	T4'	B	VIII (26), I (27), IV (28)	
		C	IV (25), V (54, 55)	
		D	VIII (40)	I (39), III (38)
		E	VIII (45), I (46)	
2006	T5	A	I (18)	
		B	I (30), VIII (31)	
		C	I (33)	
		D	I (42)	
		E	I (34), II (35)	
2007	T1''	C	V (69), VII (62)	
2007	T6	B	V (63)	
2007	T7	A		II (64)
		B	VII (66)	II (65)
		C	VII (67, 68)	II (71)
Environnement	Air		III (59)	
	Caisse de fermentation		VI (60)	
	Sac de jute		III (61)	
	Cortex de cacao		V (58)	II (70)
	Feuille de bananier			

4- 1- 3- Aspect des *A. niger* agg dans différents milieux de culture

Samson *et al.* (2007) décrivent l'aspect des colonies des diverses espèces d'*Aspergillus* noirs. Un isolat d'*A. niger* agg de chaque groupe phénotypique établi à partir de la culture sur milieu PDA a donc été cultivé sur les milieux CYA et MEA qui sont ceux utilisés par ces auteurs. Quel que soit le milieu, MEA ou CYA, il y a très peu de différences morphologiques pour la plupart des souches d'*A. niger* agg isolées. La comparaison avec les données de Samson *et al.* (2007) n'a pas permis de différencier les *A. niger* agg des groupes I, II, III, IV (Annexe 5). Seul l'*A. niger* agg du groupe V présente un phénotype proche de celui décrit comme *A. heteromorphus* par Samson *et al.* (2007) ce qui suggérerait l'appartenance à cette espèce. Cette technique est donc insuffisante pour différencier les *A. niger* agg.

4- 2- Etude génotypique

4- 2- 1- Extraction et purification de l'ADN génomique

A partir du mycélium lyophilisé, l'ADN génomique des souches d'*A. niger* agg et d'*A. carbonarius* a été extrait et purifié par Geneclean. La Figure 32 montre les bandes d'ADN obtenues après Geneclean pour quelques souches à titre d'exemple.

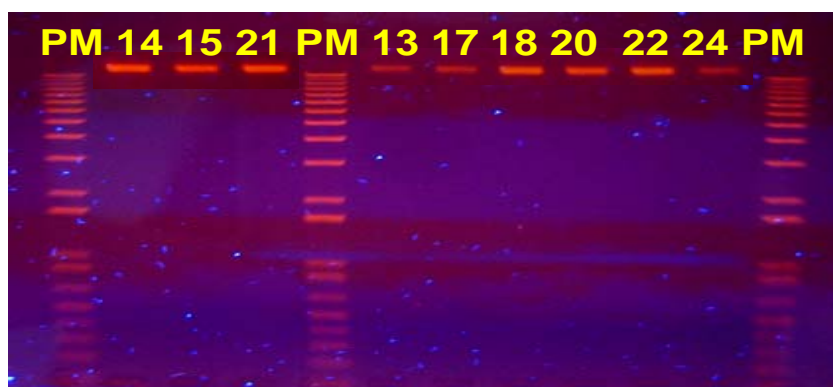


Figure 32 : Electrophorèse des ADN génomiques après purification par Geneclean

PM = indicateur de poids moléculaire

n° 14, 15 et 21 : isolats d'*A. carbonarius*

n° 13, 17, 18, 20, 22 et 25 : isolats d'*A. niger* agg

4- 2- 2- Identification des *Aspergillus* noirs

4- 2- 2- 1- PCR avec des amorces spécifiques

ITS₁/NIG et ITS₁/TUB

Un fragment de l'ADN purifié des souches d'*Aspergillus* noirs, autres qu'*A. carbonarius*, est amplifié par l'utilisation de couples d'amorces spécifiques : ITS₁ / NIG et ITS₁/TUB.

Les Figures 33 et 34 présentent un exemple de profil d'amplification avec ces amorces respectives.

Indépendamment du couple d'amorce utilisé, un fragment de 420 pb est obtenu avec toutes les souches d'*Aspergillus* noirs « non *A. carbonarius* » testées. Seule la souche n° 20 ne donne pas d'amplification avec la paire d'amorces ITS₁/NIG. Deux espèces : *A. niger* (CET 2091) et *A. tubingensis* (CBS 16179) servent de référence pour l'identité du fragment d'amplification.

Ainsi, l'identification de toutes les souches isolées et désignées préalablement comme *A. niger* agg selon les critères morphologiques est confirmée par la technique moléculaire. Par la PCR et avec ce type de couple d'amorces spécifiques, il est impossible de différencier *A. niger* de *A. tubingensis*, voire des autres espèces de la famille d'*A. niger* agg en raison de leurs séquences ITS₂ (primer Rev) très proches. Seul le séquençage permettra éventuellement de les différencier.

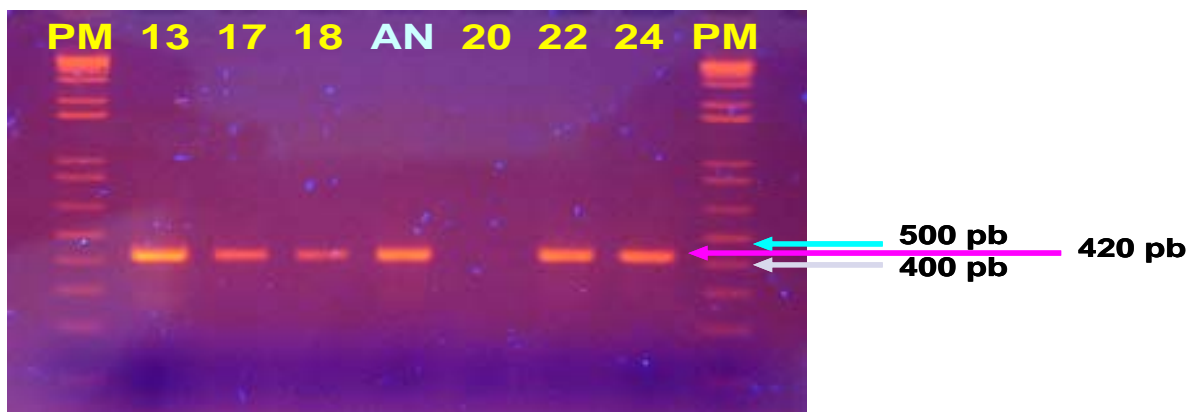


Figure 33 : Electrophorèse de l'amplification par PCR spécifique avec primer ITS₁/NIG

PM= indicateur de poids moléculaire
n° 13, 17, 18, 20, 22, 24 : isolats d'*A. niger* agg
AN : *A. niger* de référence (CET 2091)

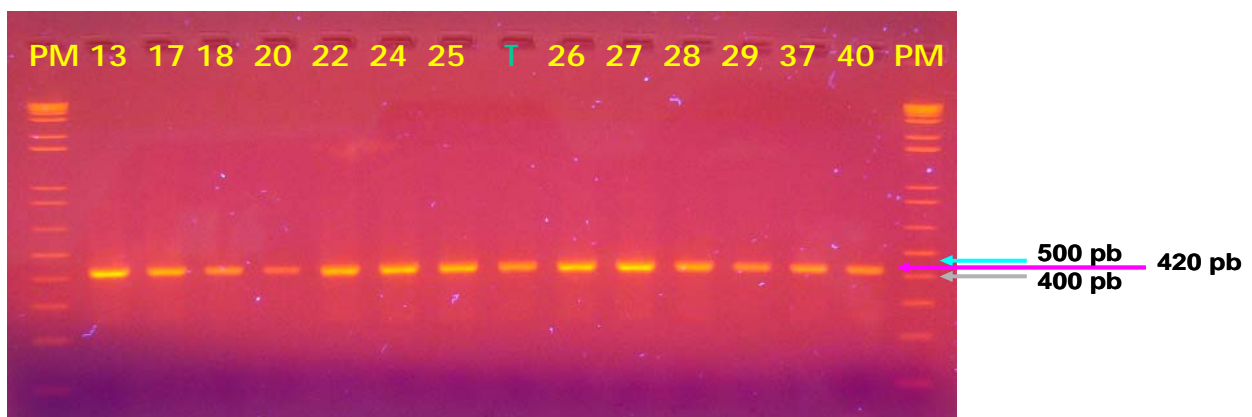


Figure 34 : Electrophorèse de l'amplification par PCR spécifique avec le primer ITS₁/TUB

PM= indicateur de poids moléculaire
n° 13, 17, 18, 20, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 37 et 40: isolats d'*A. niger* agg
T : *A. tubingensis* de référence (CBS 16179)

ITS₁/CAR

Un fragment de l'ADN purifié des souches identifiées au préalable comme *A. carbonarius* selon les critères morphologiques, est amplifié par l'utilisation du couple d'amorces spécifiques ITS₁ / CAR. La Figure 35 donne un exemple de profil d'amplification avec cette paire d'amorces.

Un fragment de 420 pb est obtenu avec toutes les souches d'*A. carbonarius*. Par la technique moléculaire, toutes les souches identifiées comme *A. carbonarius* selon les critères morphologiques sont confirmées en tant que telles.

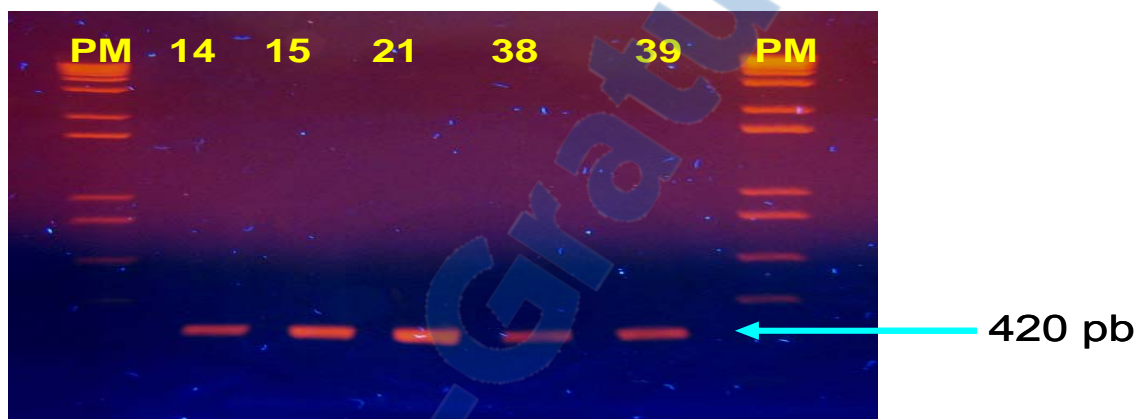


Figure 35 : Electrophorèse de l'amplification par PCR spécifique avec le primer ITS₁/CAR

PM= indicateur de poids moléculaire

n° 14, 15, 21, 38, 39 : isolats d'*A. carbonarius*

ITS₁/ELL, ITS₁/HET et ITS₁/JAP

L'*Aspergillus* noir n°20 qui donnait un résultat négatif avec ITS₁/NIG et positif avec ITS₁/TUB a été testé avec les autres amorces spécifiques (ITS₁/ELL, ITS₁/HET et ITS₁/JAP).

Le Tableau 29 suivant résume les résultats obtenus avec ces différents primers.

A l'exception du primer ITS₁/TUB, aucun fragment amplifié n'est obtenu avec les autres amorces spécifiques testées (ITS₁/ELL, ITS₁/HET, ITS₁/NIG, ITS₁/CAR et ITS₁/JAP). Ces résultats nous permettent de dire que l'*Aspergillus* noir n°20 fait partie des *A. niger* agg. Seul le séquençage pourrait permettre d'aller plus loin dans l'identification.

Tableau 29 : PCR spécifiques avec l'*A. niger* agg 20

Primers spécifiques	Amplification
ITS₁/NIG 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'/ 5'-CCG GAG AGA GGG GAC GGC-3'	-
ITS₁/TUB 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'/ 5'-CCC GGA GAG GGG GAC GGC-3'	+ (présence d'un fragment de 420 pb)
ITS₁/HET 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'/ 5'-GGA AAA TGG TTG GAG AGG TCG-3'	-
ITS₁/JAP 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'/ 5'-GAG AAG ATT GGG GGT CGA GG-3'	-
ITS₁/ELL 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'/ 5'-CCC GGG ATG GGG GAC GG-3'	-
ITS₁/CAR 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'/ 5'-AGA CAG GGG GAC GGC-3'	-

L'étude moléculaire a permis de confirmer la première détermination basée uniquement sur les critères phénotypiques.

4- 2- 2- 2- Séquençage des fragments amplifiés

Les amplifias de quelques fragments ITS₁ / ITS₂ ont été séquencés pour les souches d'*A. niger* agg 13 (P13), d'*A. niger* agg 17 (P17), d'*A. niger* agg 18 (P18), et d'*A. niger* agg 22 (P22). Les séquences, non seulement sont très proches les unes des autres, voire identiques (Annexe 6), mais sont, après alignement avec des séquences déposées en banques, identiques à *A. niger*, *A. awamori*, *A. tubingensis* ou *A. foetidus* à au moins 97 %. Pour la souche d'*A. niger* agg 20 (P20), la séquence est identique à celles des souches d'*A. niger*, *A. awamori*, *A. foetidus* avec un maximum d'identité de 100 % (Annexe 7).

On peut dire en conclusion que la comparaison de séquences ITS₁ / ITS₂ est utile, mais n'est pas suffisante pour différencier les espèces du groupe d'*A. niger* agg : les séquences comparées sont trop courtes, entraînant ainsi un faible pouvoir discriminant. Ces résultats ne

nous permettent pas d'aller plus loin dans nos analyses et conclusions. Pour parvenir à différencier efficacement ces espèces, il faudrait amplifier et séquencer un fragment beaucoup plus long (en incluant les fragments D1/D2 par exemple) de sorte à avoir une discrimination plus importante.

4- 2- 2- 3- Amplification partielle d'un fragment PKS

Les PKS fongiques sont responsables de la biosynthèse de plusieurs mycotoxines et d'autres métabolites secondaires (Varga *et al.*, 2003). Chez *A. carbonarius*, la séquence Ac12RL3 de la région Acyl transférase est responsable de la production de l'OTA (Atoui *et al.*, 2007).

La Figure 36 représente la PCR spécifique de divers isolats d'*A. carbonarius* et d'*A. niger* agg avec les primers Ac12RL-OTAF/ Ac12RL-OTAR.

Un fragment de 141 pb est amplifié avec les isolats d'*A. carbonarius* (14, 21, 38, 39, 64, 70) mais non avec les isolats d'*A. niger* agg (13, 18, 37, 42, 46, 49). Ce résultat est significatif de la spécificité de la région Acyl Transférase (AT) du gène PKS de *A. carbonarius* responsable de la production d'OTA (Atoui *et al.*, 2006). Cette spécificité de réaction a également été relevée par Atoui *et al.*, (2007) qui obtient un résultat positif uniquement avec les espèces d'*A. carbonarius* parmi 13 autres espèces étudiées.

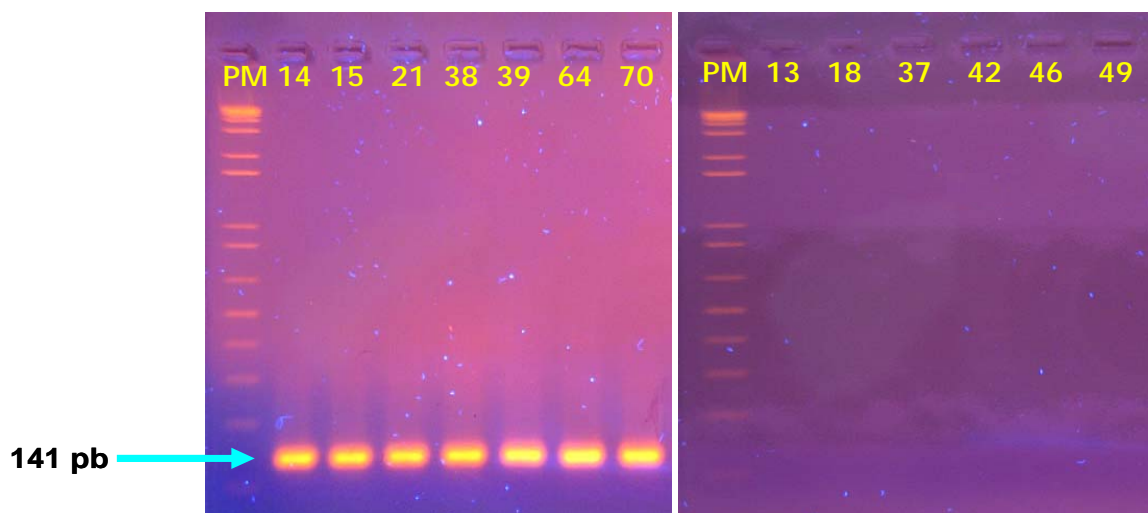


Figure 36 : Electrophorèse de la PCR spécifique avec les primers Ac12RL-OTAF/ Ac12RL-OTAR

PM: poids moléculaire,

n°14, 21, 38, 39, 64 et 70: *A. carbonarius*

n°13, 18, 37, 42, 46 et 49: *A. niger* agg

4- 3- RAPD - PCR

Le polymorphisme des ADN des souches isolées a été étudié par la technique RAPD-PCR en utilisant des amorces de 10 paires de bases (OPC). A partir des 20 OPC disponibles, 9 amorces ont été choisies en s'inspirant des travaux de Rinyu *et al* (1995). Deux amorces, avec lesquelles les bandes d'amplification sont bien distinctes avec une bonne reproductibilité ont été retenues pour la suite : Il s'agit de l'OPC 08 pour les souches d'*A. niger* agg et l'OPC 13 pour *A. carbonarius*.

Les Figures 37 et 38 donnent des exemples des profils d'amplification avec l'OPC 08 chez *A. niger* agg, et avec l'OPC 13 chez *A. carbonarius* respectivement.

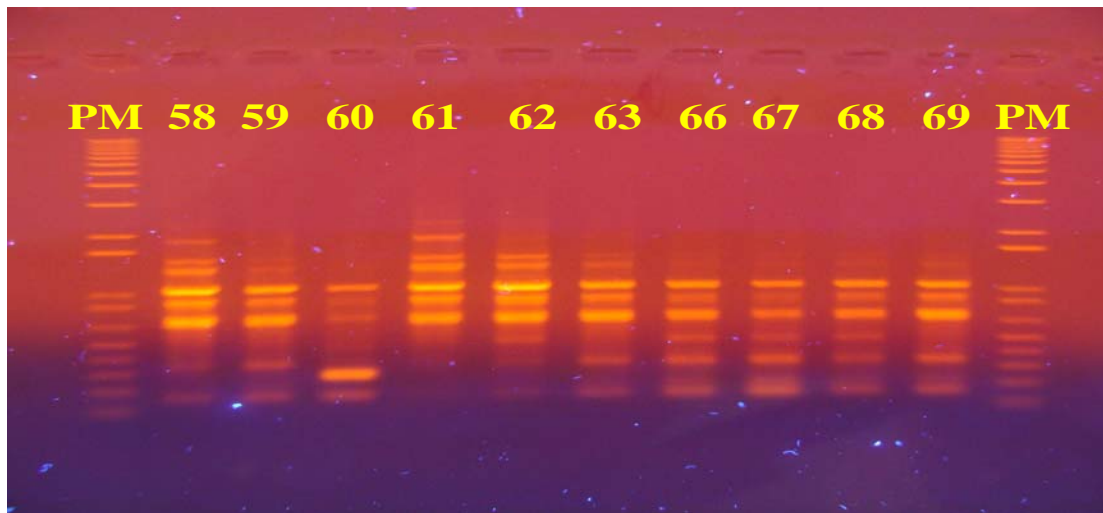


Figure 37 : Exemple de profils d'amplification par RAPD-PCR

PM= indicateur de poids moléculaire

n° 58, 59, 60, 61, 62, 63, 66, 67, 68, 69 : isolats d'*A. niger* agg

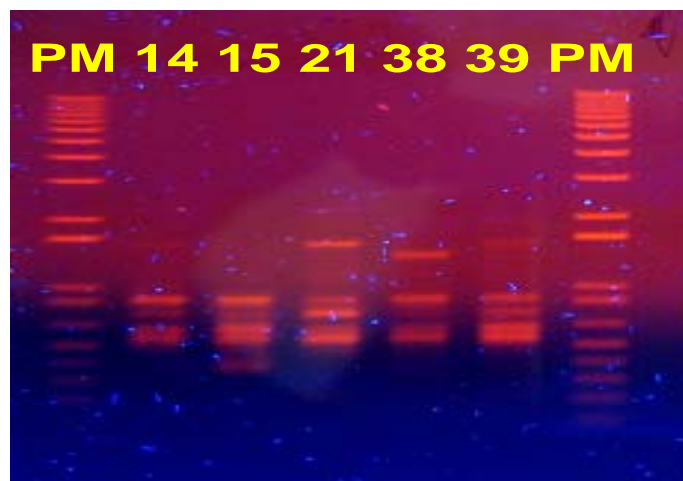


Figure 38 : Exemple de profils d'amplification par RAPD-PCR avec l'OPC 13 chez *A. carbonarius*

PM= indicateur de poids moléculaire

n° 14, 15, 21, 38, 39: isolats d'*A. carbonarius*

4- 4- Traçabilité de la souche inoculée lors de la campagne 2006

La Figure 39 représente l'étude de la traçabilité de la souche d'*A. niger* agg 18 pendant le traitement technologique T5. Cette souche, inoculée avant la mise en fermentation, est évidemment présente au stade A : les profils génomiques des *A. niger* agg 18 et 32 sont identiques. Par la suite, cette souche n'est plus retrouvée, ni pendant le traitement technologique (fermentation et séchage), ni pendant le stockage. L'étude quantitative pouvait laisser présager une implantation de la souche inoculée car une augmentation de la quantité de moisissures noires d'un facteur de 3 avait été obtenue après la fermentation (Tableau 12). De plus, la souche inoculée étant dans un bon état physiologique, les conditions semblaient favorables à son implantation. L'étude moléculaire montre qu'en réalité, la souche inoculée n'a pas pu s'implanter. Son suivi au cours des différents traitements post-récoltes n'a donc pu être réalisé. Un résultat positif à cet essai de traçabilité aurait permis de concevoir un traitement préventif à la production d'OTA basé sur une lutte biologique par compétition. L'essai n'ayant été réalisé qu'une seule fois, il est toutefois possible d'envisager un résultat différent avec une autre souche ou espèce.

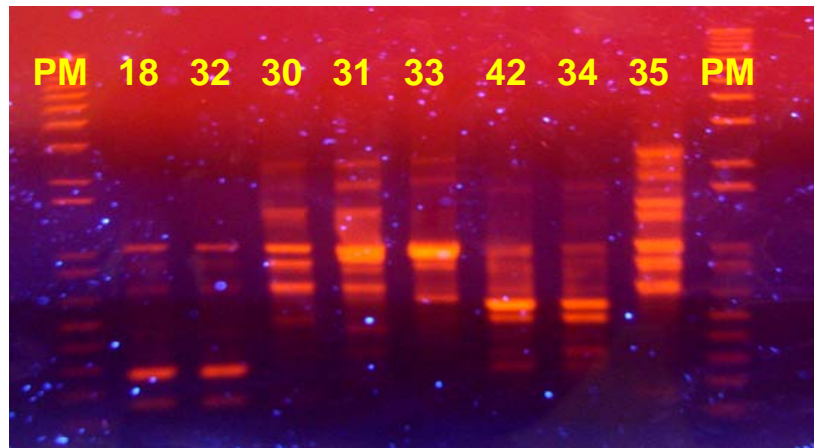


Figure 39 : Etude de la traçabilité de l'*A. niger agg* 18

PM= indicateur de poids moléculaire

n°18 : *A. niger agg* témoin

n°32 : *A. niger agg* isolé au stade A

n°30 et 31 : *A. niger agg* isolés au stade B

n°33 : *A. niger agg* isolé au stade C

n°42 : *A. niger agg* isolé après 2 mois de stockage

n°34 et 35 : *A. niger agg* isolés après 4 mois de stockage

4- 5- Discussion

4- 5- 1- Présentation globale de la diversité et relation avec l'OTA

Les différents profils d'amplification obtenus avec les espèces d'*A. niger agg* et *A. carbonarius* sont exploités sous forme de dendrogrammes. Les Figures 40 et 41 donnent les dendrogrammes globaux chez les espèces d'*A. niger agg* et d'*A. carbonarius* respectivement.

Chez *A. niger agg*, le dendrogramme fait ressortir 2 grands groupes d'individus distincts à l'intérieur desquels se retrouvent des sous-groupes. Seuls 3 isolats d'*A. niger agg* capables de produire l'OTA ont été isolés dans cette étude. Ces *A. niger agg* producteurs d'OTA (13, 17 et 24) sont repartis dans les 2 grands groupes. Les *A. niger agg* 17 et 24 sont groupés et ont les mêmes profils d'amplification tandis que l'*A. niger agg* N°13 est un peu différent. Son profil d'amplification diffère de 43 % des 2 autres souches productrices. Il est donc ainsi difficile d'établir une relation claire entre le profil génomique et la production d'OTA chez les *A. niger agg*.

Chez *A. carbonarius*, les souches sont un peu plus apparentées car la différence des profils d'amplification maximale qu'on puisse avoir entre les isolats est de 32 %. Au cours de notre

étude, toutes les souches d'*A. carbonarius* isolées sont productrices d'OTA. Il est ainsi difficile d'établir une relation entre le profil génomique et la production d'OTA.

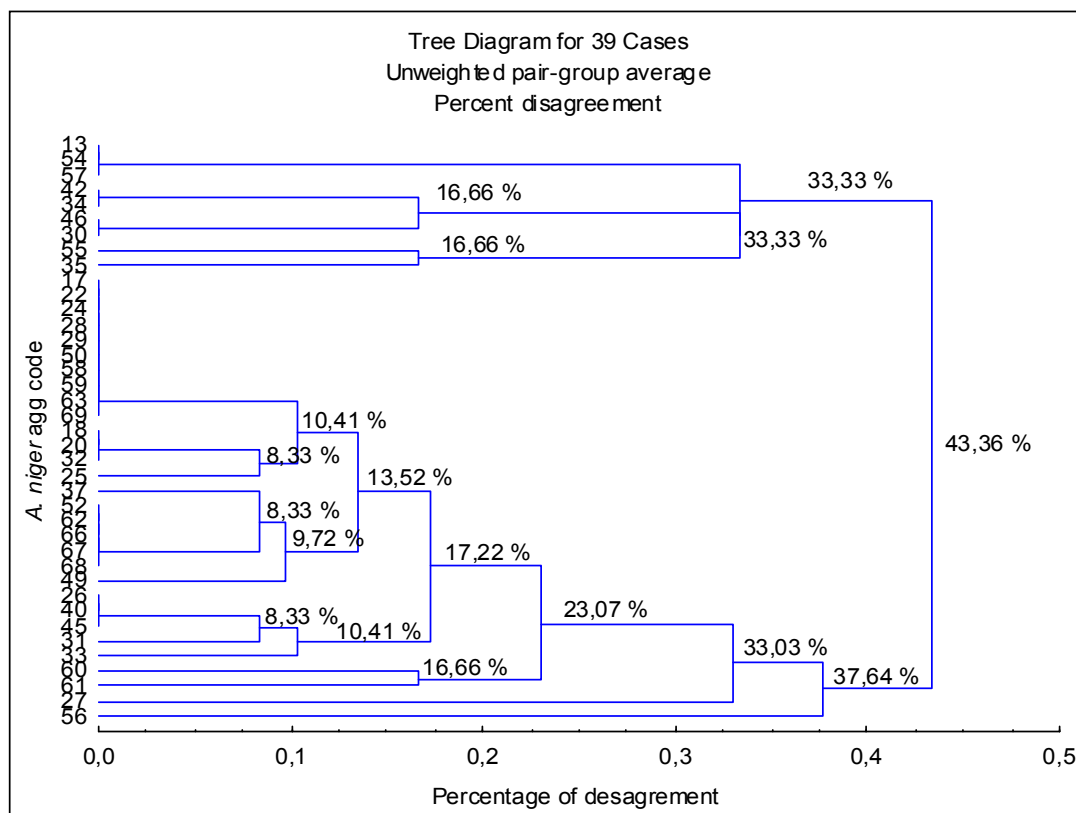


Figure 40 : Dendrogramme global chez *A. niger* agg.

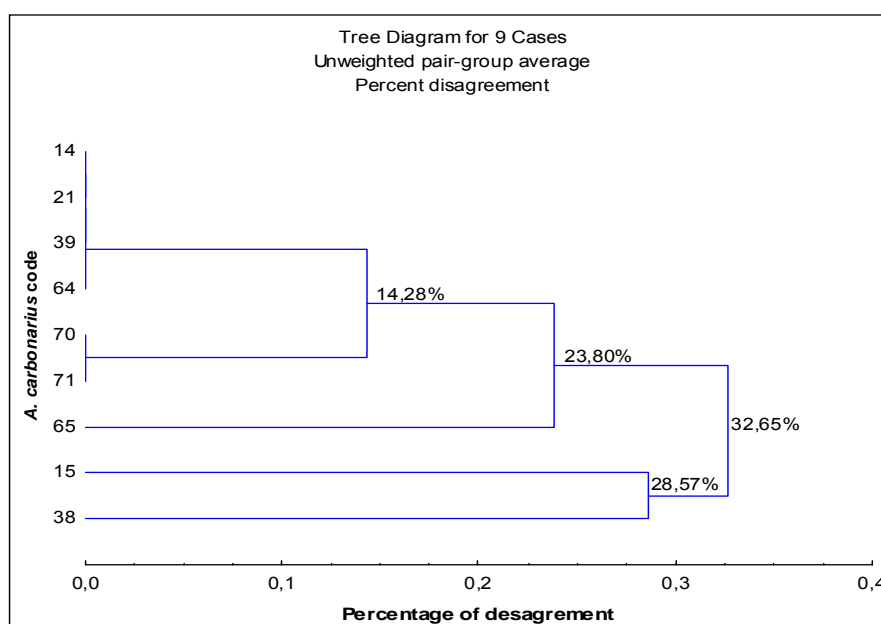


Figure 41 : Dendrogramme global chez *A. carbonarius*.

4- 5- 2- Incidence des paramètres environnementaux et post-récolte sur la biodiversité chez *A. niger* agg

4- 5- 2- 1- Influence de l'année de la campagne cacaoyère

Afin de mieux visualiser l'influence de l'année de la récolte sur les souches d'*A. niger* agg isolées, le dendrogramme global a été redessiné pour chacune des trois années d'étude. La Figure 42 représente le dendrogramme des *A. niger* agg pour chaque année de campagne cacaoyère.

Sur 3 campagnes cacaoyères successives (2005, 2006 et 2007), il est possible de retrouver des souches d'*A. niger* agg ayant le même profil d'amplification. C'est le cas des *A. niger* agg 17, 22, 24 et 50 isolées en 2005, des *A. niger* agg 28 et 29 isolées en 2006, des *A. niger* agg 58, 59, 63 et 69 isolées en 2007. De même, les souches peuvent être identiques seulement pendant deux années successives : la souche n°13 (isolée en 2005) est identique aux souches n°54 et 57 (isolées en 2006).

En conclusion, l'année de la campagne cacaoyère semble avoir peu d'influence sur la biodiversité des *A. niger* agg car la majorité des souches restent les mêmes sur les 3 ans.

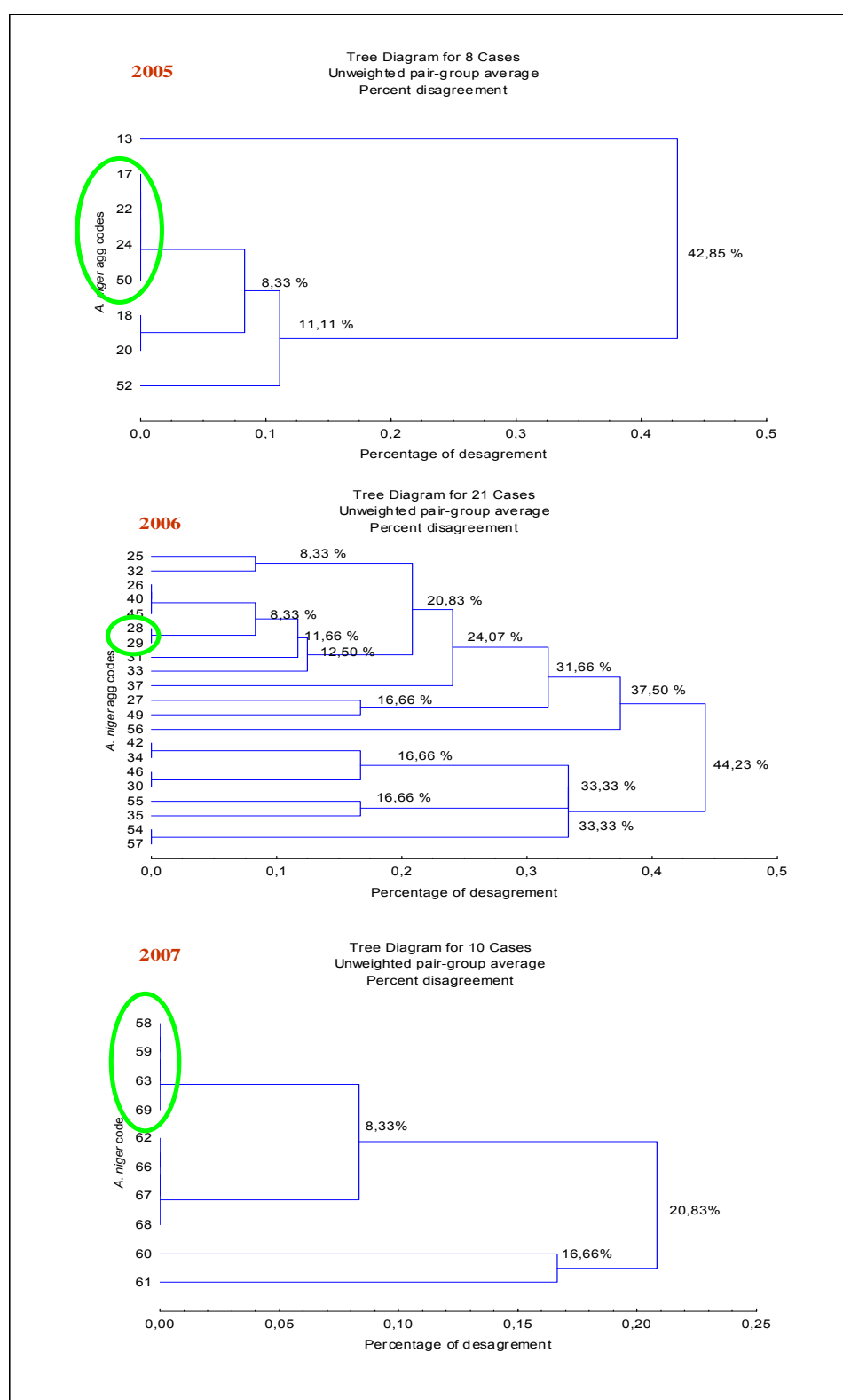


Figure 42 : Dendrogramme des *A. niger* agg par année de campagne cacaoyère

4- 5- 2- 2- Influence du type de traitement

La Figure 43 suivante illustre l'influence du type de traitement subi sur la biodiversité des *A. niger* agg isolés, ceci sur une année de la campagne cacaoyère et un stade donné de la transformation des fèves.

Un même profil d'amplification est obtenu avec l'*A. niger* agg 17 qui a été isolée d'une fermentation en caisse à partir des fèves issues des cabosses entières (T2), et les *A. niger* agg 22, 24 et 50 qui ont été isolées d'une fermentation en tas des fèves issues des cabosses blessées (T4). Ces 2 groupes de souches ont en commun le fait qu'ils soient issus de la campagne cacaoyère 2005 et sont isolés après la fermentation (stade B).

De même, pendant la campagne cacaoyère 2007, des profils d'amplification différents de 8,33 % sont obtenus entre les souches isolées après la fermentation des fèves issues des cabosses abîmées avec un écabossage immédiat (*A. niger* agg 63) ou bien différé (*A. niger* agg 66).

Le type de traitement subi n'influence donc pas de façon sensible la biodiversité des *A. niger* agg.

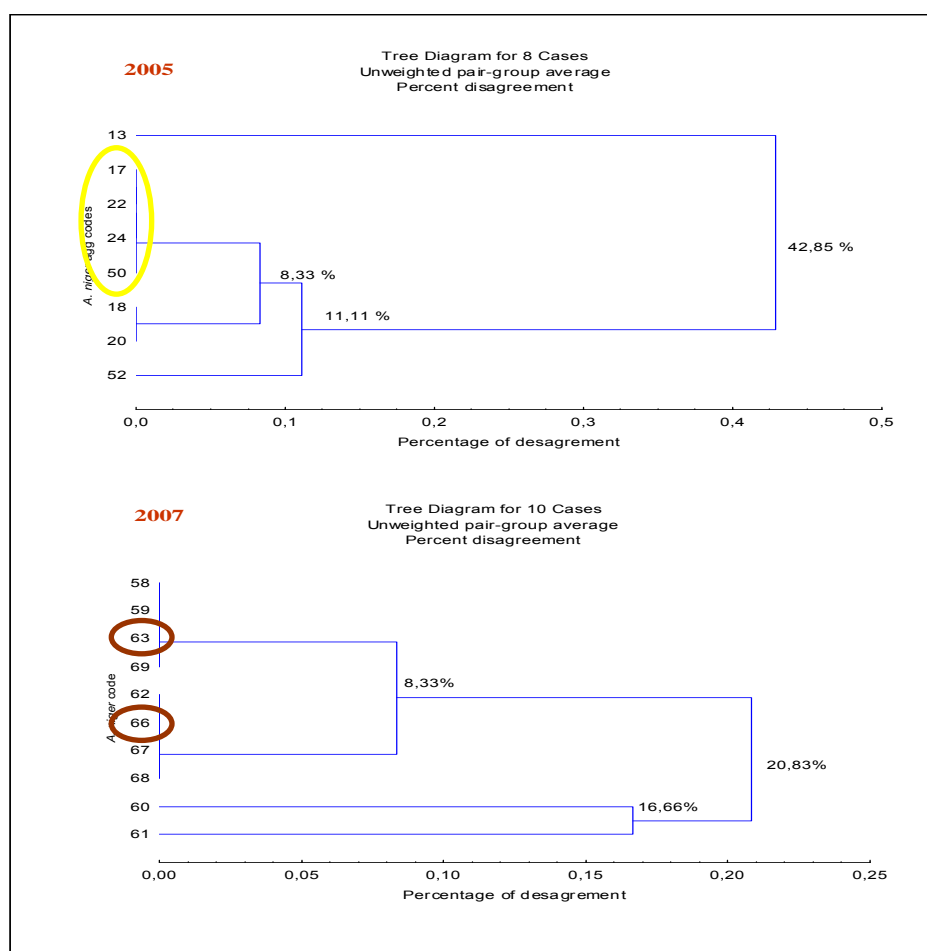


Figure 43 : Influence du type de traitement sur la biodiversité des *A. niger* agg.

4- 5- 2- 3- Influence du degré de transformation des fèves

La Figure 44 représente l'influence du degré de transformation des fèves sur la biodiversité des *A. niger* agg.

Pendant la campagne cacaoyère 2006, les souches d'*A. niger* agg isolées pendant tous les stades de transformation des fèves (A, B ou C) selon le type de traitement T4 (fermentation en tas des fèves issues des cabosses blessées et d'un écabossage après 10 j) sont comparées. Une différence de profil d'amplification pouvant atteindre 43,8 % est obtenue entre les *A. niger* agg °26, 27 et 28 (stade B) et les *A. niger* agg 25, 54 et 55 (stade C).

Il est donc possible que la biodiversité des *A. niger* agg soit influencée par le degré de transformation de la fève.

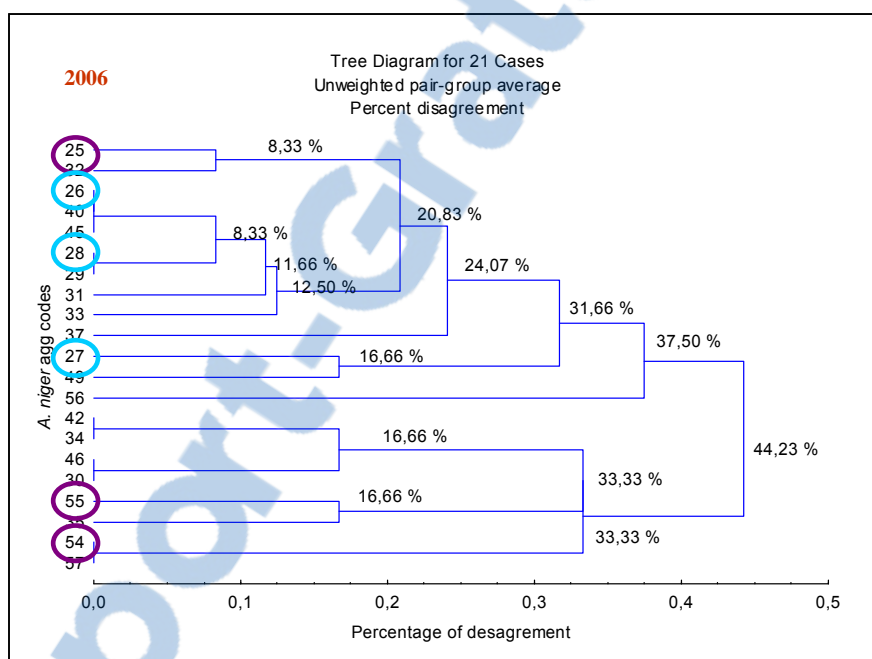


Figure 44 : Influence du degré de transformation des fèves de cacao sur la biodiversité des *A. niger* agg

4- 5- 3- Incidence des paramètres environnementaux et post-récoltes sur la biodiversité chez *A. carbonarius*

La Figure 45 suivante représente l'influence des paramètres environnementaux et post-récolte sur la biodiversité chez *A. carbonarius*.

Comme chez *A. niger* agg, il est possible de trouver des souches d'*A. carbonarius* ayant des profils d'amplification identiques sur 3 campagnes cacaoyères successives : *A. carbonarius* 14 et 21 (année 2005), *A. carbonarius* 39 (année 2006) et *A. carbonarius* 64 (année 2007).

Sur une même campagne cacaoyère (2005), et un même degré de transformation des fèves (stade C), l'*A. carbonarius* 15 isolé d'une fermentation en tas présente un profil génomique différent de 32,6 % de l'*A. carbonarius* 21 isolé d'une fermentation en caisse.

Le profil génomique des souches d'*A. carbonarius* diffère avec l'étape de transformation pour une année et un traitement donné (ex campagne 2007, T7: Les *A. carbonarius* 64, 65 et 71 isolées aux étapes A, B et C sont différentes de 23,8 %)

La biodiversité des *A. carbonarius* n'est pas influencée par l'année de la campagne cacaoyère. Par contre, elle peut être influencée par le type de traitement subi ou bien le niveau de transformation des fèves de cacao.

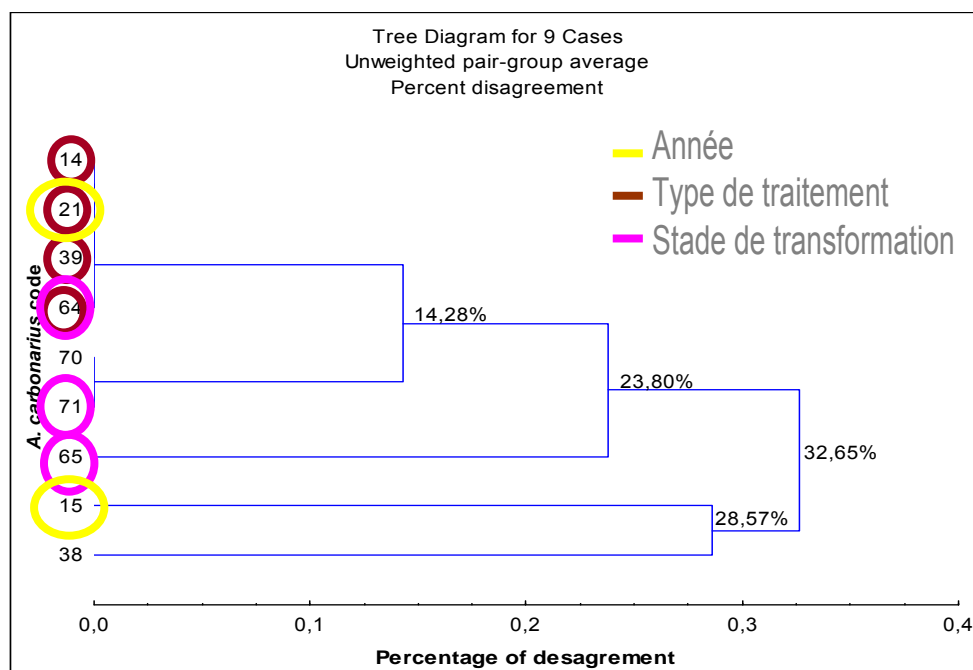


Figure 45 : Influence des paramètres environnementaux et post-récolte sur la biodiversité chez *A. carbonarius*.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Ce travail avait pour objectif principal de comprendre les conditions de développement et de toxinogénèse des micro-organismes responsables de la production de l'ochratoxine A dans la filière cacao lors des traitements post-récolte. Ceci a été réalisé au cours de différents types de traitements correspondant aux pratiques couramment utilisées au Cameroun, notamment en prenant en compte l'incidence de l'intégrité de la cabosse de cacao. Dans le cadre de cette étude, l'impact des facteurs chimiques et environnementaux sur la croissance et la toxinogénèse des souches productrices isolées a également été considéré *in vitro*. Parallèlement, une étude sur la biodiversité des *Aspergillus* noirs apparus pendant les différents traitements technologiques du cacao a été entreprise.

Les suivis microbiologiques réalisés au cours de la transformation des fèves de cacao lors de 7 types de traitements post-récolte répartis sur 3 campagnes cacaoyères successives ont permis d'observer que le cacao était fortement contaminé par les moisissures à ce stade de transformation. Le type de traitement post-récolte (caisse ou tas) n'a pas montré d'influence significative sur la microflore fongique. Par contre l'intégrité de la cabosse et le délai d'écabossage constituent les facteurs aggravants de cette contamination et les souches réputées comme productrices d'OTA ont pu être isolées dès l'écabossage lorsque les cabosses sont abîmées.

Les souches fongiques isolées appartiennent aux genres *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Aspergillus*, ce dernier genre incluant des souches potentiellement productrices d'OTA (*A. niger* agg et *A. carbonarius*). L'année de la campagne cacaoyère n'a pas d'influence sur la qualité de la microflore fongique. Aucune souche de *Penicillium verrucosum* n'a été isolée. *A. niger* agg est la souche la plus abondante. Par contre, *A. carbonarius* est principalement isolée lorsque les fèves sont issues d'un écabossage différé des cabosses abîmées. L'étude de la toxinogénèse *in vitro* a montré que les souches isolées ne présentent pas les mêmes potentiels toxiques : 100 % d'isolats d'*A. carbonarius* sont producteurs d'OTA contre seulement 8 % d'isolats d'*A. niger* agg. La production quantitative d'OTA est très variable selon la souche et le substrat : *A. carbonarius* est responsable de plus fortes teneurs en OTA (production maximale sur milieu « riz » : 2772 ng.g⁻¹) que *A. niger* agg (teneur maximale sur le même milieu : 3,6 ng.g⁻¹) le milieu de

culture « riz » (milieu officiellement utilisé pour cette recherche) est plus propice à la production d'OTA que le « milieu cacao » (milieu naturel reproduit pour les besoins de cette étude).

Nos travaux ont montré qu'à 25°C, la croissance des souches d'*A. niger* agg ou d'*A. carbonarius* n'est pas influencée par l' A_w du milieu de culture. L'optimum de croissance est compris entre 0,95 et 0,99 chez *A. niger* agg et 0,90 et 0,99 chez *A. carbonarius*. Par contre, la production d'OTA par ces souches est plus dépendante de l'activité de l'eau du milieu. L'optimum de production d'OTA est obtenu à 0,99 d' A_w chez *A. niger* agg et de 0,95 à 0,99 d' A_w chez *A. carbonarius*. Pendant le séchage solaire du cacao, les fèves restent 5 à 7 jours à une activité de l'eau comprise entre 0,85 et 0,99, dont 2 à 4 jours à 0,95. Il conviendrait donc de réduire au maximum cette période de séchage afin de limiter les risques de contamination par l'OTA. La toxinogénèse peut également être influencée par certains alcaloïdes naturellement présents dans la fève de cacao : caféine, théobromine et épicatechine. La caféine a une action plus marquée (la production d'OTA peut être totalement inhibée lorsque la teneur en caféine du milieu de culture atteint 2,5 mg.g⁻¹) tandis que la théobromine et l'épicatechine n'ont pas montré d'effet sensible sur la production d'OTA. Toutefois, il est difficile d'intervenir sur les paramètres de composition du cacao.

Les *Aspergillus* noirs isolés des fèves de cacao présentent une biodiversité très importante. L'identification et la différenciation de ces souches selon les critères phénotypiques restent sujettes à controverse. L'identification de ces *Aspergillus* grâce à des techniques par PCR avec des amorces spécifiques a permis de séparer *A. carbonarius* et le complexe d'*A. niger* agg. Cependant, en l'état actuel de nos travaux, ni cette technique (PCR avec des amorces spécifiques), ni le séquençage du fragment amplifié, ne permettent de séparer les différents membres de ce complexe.

Les différents profils génomiques obtenus par RAPD-PCR des souches d'*A. carbonarius* et d'*A. niger* agg ont été exploités sous forme de dendrogrammes. Les similarités des profils d'amplification obtenus, tant avec les isolats producteurs comme non-producteurs d'OTA, n'ont pas permis de mettre en évidence une relation claire entre le génotype et la production d'OTA.

L'année de la campagne cacaoyère et le type de traitement post-récolte semblent avoir peu d'influence sur la biodiversité des *A. niger* agg car des ressemblances de profils d'amplification sont obtenues. Par contre, il est possible que cette biodiversité soit influencée par le degré de transformation de la fève (non fermentée, fermentée et non séchée, fermentée et séchée). Chez *A. carbonarius*, la biodiversité n'est pas influencée par l'année de la campagne cacaoyère. Elle peut être influencée par le type de traitement subi (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7) ou bien le niveau de transformation des fèves de cacao.

Les résultats obtenus dans cette étude n'ont pas montré de différences significatives de la qualité de la microflore fongique et de la production d'OTA dues aux différents traitements post-récolte du cacao. Seul l'état de la cabosse auquel s'ajoute le délai d'écabossage sont des facteurs importants pour le niveau de contamination par l'OTA.

Plusieurs propositions peuvent donc être faites afin de réduire les taux de contamination du cacao par l'OTA :

Au niveau du champ, des contaminations peuvent être évitées par une bonne gestion agricole. Comme avec d'autres cultures (les fruits en général), il est envisageable de faire un tri des cabosses après récolte, afin que seules les cabosses saines et intègres soient écabossées sans délai.

Pendant la fermentation, la prolifération d'*A. carbonarius*, principal producteur d'OTA, est freinée. Il existe probablement des phénomènes d'antibiose qui peuvent être exploités.

Pendant le séchage et le stockage du cacao, l' A_w constitue le facteur critique de contamination par l'OTA. Le stockage devrait ainsi se faire sous atmosphère contrôlée afin d'éviter toute ré-humidification. Il ressort de cette étude que la meilleure alternative pour limiter la contamination par l'OTA est la prévention aussi bien avant le traitement post-récolte qu'au niveau du séchage et du stockage du cacao marchand.

Quelles sont les perspectives et les pistes à explorer pour approfondir ce travail ?

Des techniques rapides de détection de l'OTA doivent être développées et mises à la disposition des pays producteurs. La méthode officielle de dosage de l'OTA préconise l'utilisation de la chromatographie HPLC couplée à une détection fluorimétrique : ce type de matériel et technique d'analyse sont difficiles à mettre œuvre en milieu rural. Il existe des kits

immuno-enzymatiques (test Elisa) qui devraient être améliorés. Ces systèmes sont relativement faciles à utiliser et leurs résultats à interpréter.

La détection et l'identification des moisissures peuvent être améliorées. Cette proposition ne concernerait pas directement les producteurs mais pourrait être utile pour les laboratoires de contrôle qualité. Une solution est la mise au point de milieux plus spécifiques et capables de discriminer les genres ou espèces recherchés.

D'un point de vue plus fondamental, l'étude par la biologie moléculaire doit être poursuivie. La différenciation des espèces de la famille *A. niger* agg pourrait être tentée par exemple par un séquençage plus long de l'ADNr, les fragments ITS₁ et ITS₂ étant relativement courts. La comparaison de leurs séquences ne permet pas en effet de discriminer les différentes espèces. Il serait ainsi judicieux d'étudier aussi les séquences de leurs domaines D1/D2 de façon à pouvoir disposer d'un pouvoir discriminant plus important.

La lutte biologique par voie fermentaire pourrait être utilisée comme moyen préventif et/ou curatif. Cela pourrait en effet être réalisé par l'ensemencement lors de la mise en fermentation de bactéries lactiques ou de moisissures de type *Mucor* susceptibles d'inhiber la croissance ou la toxinogénèse des souches productrices présentes, voire même de dégrader l'OTA.

Des campagnes de sensibilisation, formation et information des planteurs doivent être entreprises afin d'améliorer leur travail. Afin d'être efficaces, les planteurs doivent être mieux organisés en se regroupant sous forme de GIC (Groupements d'Initiatives Communes) ou d'ONG (Organisation Non Gouvernementale).

Les planteurs doivent être informés de la nécessité de respecter des conditions d'hygiène adéquates.

L'impact de l'intégrité de la cabosse sur la qualité du produit final doit être souligné. En milieu rural, certaines habitudes sont relayées de père en fils. Pendant la campagne cacaoyère, l'écabossage des cabosses récoltées par chaque planteur est faite par tous les planteurs du village réunis, et ceci à tour de rôle. Afin d'avoir des quantités importantes de cabosses, la récolte peut s'étaler sur plusieurs jours, voire des semaines. Ceci engendre donc la dégradation des premières cabosses récoltées. Dans le souci d'obtenir un produit de qualité, des rites de ce genre sont à améliorer.

A l'échelle nationale, la filière cacao doit être mieux structurée afin de protéger les planteurs. Ces derniers sont la plupart du temps la cible des intermédiaires qui achètent le cacao pour le revendre aux exportateurs. Le cacao est acheté auprès du planteur à un prix dérisoire, et vendu aux exportateurs au prix fort. Les frais engagés par le planteur pour l'achat des intrants agricoles, la main d'œuvre et le petit matériel sont souvent à peine couverts, ceci n'encourageant pas le planteur à bien travailler. La libéralisation du marché de cacao en définitive n'est pas profitable au planteur.

Cependant, face à la norme sur le cacao en cours d'élaboration par l'Union Européenne, le planteur devra inévitablement consentir de gros efforts pour améliorer sa façon de travailler s'il veut continuer à vendre son produit.

L'élaboration d'un guide de bonnes pratiques agricoles simple et réaliste semble être une première étape incontournable à cette amélioration.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Abarca, M.L., Bragulat, G., Castella, G., Cabans, F.J., 1994. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**: 2650-2652.
- 2- Aboul-Enein, H.Y., Banu, O., Altioikka, G., Tunçel, M.A., 2002. A modified HPLC method for the determination of ochratoxin A by fluorescence detection. *Biomedical Chromatography*, **16**: 470-474.
- 3- Accensi, F., Cano, J., Figuera, L., Abarca, M.L., Cabanes, F.J., 1999. New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. *FEMS Microbiology Letters*, **180**, 191-196.
- 4- Al-Musallam, A., 1980. Revision of the black *Aspergillus* species. *Ph.d. thesis*. Rijksuniversiteit Utrecht.
- 5- Alvarado, J.D., Villacis, F., Zamora, G., 1983. Efecto de la epoca de cosecha sobre la composicion de cotiledones crudos y fermentados de dos variedades de cacao y fracciones de cascarilla. *Archivos latinoamericanos de nutricion*, **2**: 339-355.
- 6- Amézqueta, S., Gonzalez-Penas, E., Murillo, M., Lopez de Cerain, A., 2004. Validation of high-performance liquid chromatography analytical method for ochratoxin A quantification in cocoa beans. *Food Additive and Contaminants*, **22**: 1096-1106.
- 7- Amézqueta, S., Gonzalez-Penas, E., Murillo, M., Lopez de Cerain, A., 2005. Occurrence of ochratoxin A in cocoa beans : effect of shelling. *Food Additives and Contaminants*, **22**: 590-595.
- 8- Amézqueta, S., González-Peñas, E., Dachoupakan, C., Murillo-Arbizu, M., López de Cerain, A., Guiraud JP., 2008. OTA-producing fungi isolated from stored cocoa beans. *Letters in Applied microbiology*, **47**: 197-201.
- 9- Araguàs, C., González-Penas, E., Lopez de Cerain A., Bello, J., 2003. Acerca de la posible contaminacion por ocratoxina a en alimentos I : cereales cultivados en diversas zonas geográficas de la comunidad foral de Navarra. *Alimentaria*, 23-29.
- 10- Ardhana, M.M., Fleet, G.H., 2003. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, **86**: 87-99.
- 11- Atalla, M.M., Hassanein, N.M., El-Beih, A.A., Youssef, Y.A.G., 2003. Mycotoxin production in wheat grains by different *Aspergilli* in relation to different relative humidities and storage periods. *Nahrung*, **47**: 6-10.
- 12- Atoui, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., 2007. Targeting a polyketide synthase gene for *Aspergillus carbonarius* quantification and ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR. *International Journal of food microbiology*, **115**: 313-318.

- 13- Atoui, A., Phong Dao, H., Mathieu, F., Lebrihi, A., 2006. Amplification and diversity analysis of ketosynthase domains of putative polyketide synthase genes in *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* producers of ochratoxin A. *Mol., Nutr. Food Res.*, **50**: 488-493.
- 14- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Sidman, J., Smith, J., Struhl, K., 1995. Short protocols in molecular biology (third edition), chap 13, part 13-11, 13-45, 13-46.
- 15- Axberg, K., Jansson, G., Svensson, G., Hult, K., 1997. Varietal differences in accumulation of ochratoxin A in barley and wheat cultivars after inoculation of *Penicillium verrucosum*. *Acta Agriculture Scandinavica*, **47**: 229-237.
- 16- Aziz, N.H., Moussa, L.A.A. Far FME., 2004. Reduction of fungi and mycotoxins formation in seeds by gamma-radiation. *Journal of food Safety*, **24**: 109-127.
- 17- Bankole, S.A., Adebajo, A., 2003. Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it. *African Journal of Biotechnology*, **2**: 254-263.
- 18- Barel, M., 1997. La fermentation du cacao: le moyen de l'apprécier et de la maîtriser. *Industries Alimentaires et Agricoles*, **4** : 211-214.
- 19- Bastide, P., Fourny, G., Durand, N., Petithuguenin, P., Guyot, B., Gilmour, M., Lindblom, M., 2006. Identification of ochratoxin A sources during cocoa post-harvest processing: influence of harvest quality and climatic factors. 15th Intl Cocoa Res. Conf., San Jose, Costa Rica, 9-17 October 2006.
- 20- Battilani, P., Giorni, P., Pietri, A., 2003. Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. *European Journal of Plant Pathology*, **109** : 715-722.
- 21- Bau, M., Castella, G., Bragulat, M.R., Cabanes, F.J., 2006. RFLP characterization of *Aspergillus niger* aggregate species from grapes from Europe and Israel. *International Journal of Food Microbiology*, **115**: 313-318.
- 22- Bayman, P., Baker, J.L., Doster, M.A., Michailides, T.J. and Mahoney, N.E., 2002. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* Group and *Aspergillus alliaceus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 2326-2329.
- 23- Belli, N., Bau, M., Marin, S., Abarca, M.L., Ramos, A.J., Bragulat, M.R., 2006. Mycobiota and ochratoxin A fungi from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, **111**, S40-S45.
- 24- Belli, N., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marin, S., 2004. Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology*, **38**: 72-77.
- 25- Bennet, J.W.; Klich, M.A., 1992. *Aspergillus*: Biology and Industrial Applications, Butterworth-Heinemann, Boston, USA

- 26- Beretta, B., De Domenico, R., Gaiaschi, A., Ballabio, C., Galli, C.L., Gigliotti, C., Restani, P., 2002. Ochratoxin A in cereal-based baby foods : occurrence and safety evaluation. *Food Additives and Contaminants*, **19**: 70-75.
- 27- Biehl, B. et al., 1982. Chemical and physical changes in the pulp during ripening and post-harvest storage of cocoa pods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **48**: 189-208.
- 28- Blateyron, L., Michel, G., Delteil D., 2001. Des contaminants dans le vin: l'ochratoxine A. *Rapport ICV*.
- 29- Bonvehí, S.J., 2004. Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate. *J. Agric. Food chem.*, **52**: 6347-6352.
- 30- Boorman, G.A., 1989. Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A in F344/N rats. NTP technical report NTP TR 358.
- 31- Bopajah, B.V., 1991. Influence of season and drying temperature on the quality of cocoa beans. *Indian Cocoa, Arecanut and Spices Journal*, **2**: 37-39.
- 32- Bordas, E., Bretter, E., Costin, L., Lenghel L., 1973. Etude épidémiologique de la néphropathie. *Rev. Epidem. Méd. Soc. et santé Publ.*, **21** : 481- 498.
- 33- Boudra, H., Le Bars, P., Le Bars, J., 1995. Thermostability of Ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**:1156-1159.
- 34- Bourgeois, C.M., Larpent, J.P., 1985. La fermentation du cacao. *Microbiologie Alimentaire. Technique et Ingénierie. Série Agro-Alimentaire*. Dunod. Paris, **2** : 275-286.
- 35- Braudeau, J., 1969. Le cacaoyer. In *Techniques Agricoles et Productions Tropicales*. Maisonneuve and Larousse, London : pp 23-218.
- 36- Brera, C., Grossi, S., de Santis B., Miraglia M., 2003. High performance liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in cocoa powder. *Journal of Liquid Chromatography and related technologies*, **26**: 585-598.
- 37- Buchanan R.L., Tice G., Marino D., 1981. Caffeine inhibition of ochratoxin A production. *Journal of Food Science*, **47**: 319-321.
- 38- Bu'Lock, J.D., Jacquet, J., 1965. Secondary metabolism : an explanation in terms of induced enzyme mechanisms. *Experimental*, **21**: 55-56.
- 39- Bünge, J., Westphal, G., Monnich, A., Hinnendahl, B., Hallier, E., Müller, M., 2004. Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. *Toxicology*, **202**: 199-211.
- 40- Bunting, R.H., 1928. Fungi occurring in cocoa beans. Department of Agriculture Gold Coast year Book bull, **16**: 44-62.

- 41- Burdaspal, P.A., Legarda, T.M., 1998. Ocratoxina A en muestra de café comercializado en España. *Alimentaria* 31-35.
- 42- Burdaspal, P.A., Legarda, T.M., 1999. Ocratoxina A en vinos, mostos y zumos de uva elaborados en España y en otros país europeos. *Alimentaria* 107-113.
- 43- Burdaspal, P.A., and Legarda, T.M., 2003. Ochratoxin A in samples of different types of chocolate and cacao powder, marketed in Spain and fifteen foreign countries. *Alimentaria*, **40**: 143-153.
- 44- Cabrera, H.A.P., Taniwaki, M.H., Menezes, H.C., Iamanaka, B.T., Salgado, S.A., 2001. Ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee as affected by alternating temperature and different water activity values. In *19th ASIC coffee Conference*, Trieste, Italy, 14-18 May.
- 45- CAOBISCO/ECA/FCC, 2003. CAOBISCO/ECA/FCC update position on ochratoxin A in cocoa and chocolate products. CAOBISCO/ECA/FCC, **725**: 1-752:...
- 46- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J.S., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., 2007. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacterian, involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 1809-1824.
- 47- Car, J.C., Davies, A.P., Dougan, J., 1979. Cocoa fermentation in Ghana and Malaysia. 7ème Conférence Internationale sur la Recherche Cacaoyère, Library of Congress. Washington.DC. USA, 4-12: 573-576.
- 48- Car, J.G., 1982. Cocoa. Rose A.M. Ed. Fermented Food. Economic Microbiology. Academic Press. London. 1982, **7**: 275-292.
- 49- Castella, G., Larsen, T.O., Cabanes, J., Schmidt, H., Alboresi, A., Niessen, L., Färber, P., Geisen, R., 2002. Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Syst. Appl. Microbiol.*, **25**: 74-83.
- 50- Chelack, W.S., Borsa, J., Marquardt, R.R., Fohlich, A.A., 1991. Role of the competitive microbial flora in the radiation-induced enhancement of ochratoxin production by *Aspergillus alutaceus* var. *alutaceus* NRRL 3174. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**: 2492-2496.
- 51- Chernozemsky, I.N., Stoyanov, I.S., Petkova-Bocharova, T.K., Nicolov, I.G., Draganov, I.G., Stoichev, I., Tanchev, Y., Naidenov, D., Kalcheva, N.D., 1977, Geographic correlation between the occurence of endemic nephropathy and urinary tract tumours in Vratza district. *Bulgaria international journal of cancer*, **19**: 1-11.
- 52- Chiavaro, E., Lepiani, A., Colla, F., Bettoni, P., Pari, E., Spotti, E., 2002. Ochratoxin A determination in ham by immunoaffinity clean-up and quick fluorimetric method. *Food Additives and Contaminants*, **19**: 575-581.

- 53- Ciferri, R., 1931. Studies on cocoa. *Journal of the Department of Agriculture Porto Rico*, **15**: 223–286.
- 54- COCOQUAL, 2006. Unpublished work: Developing biochemical and molecular markers as indices for improving quality assurance in the primary processing of cocoa in West Africa. Fourth Annual Report. Individual Partner Annual Reports. (Analysis of the mycological status of cocoa beans with emphasis on ochratoxigenic fungi) Projet N°.ICA4-CT-2002-10040 (EU 5th FP INCO-DEV Projet)
- 55- Copetti, M.V, Iamanaka, B.T., Taniwaki, M.H., 2006. Toxigenic fungi in cocoa and cocoa products. A joint Symposium of ICFM and ICIF at the 8th International Mycological Congress, Cairns, August 19-20, 2006.
- 56- Cros, E., 1995. Influence de la fermentation et du séchage sur la qualité du cacao. *Marchés Tropicaux et Méditerranéens*, **2571** : 370-372.
- 57- Cuatrecasas, J., 1964. Cocoa and its allies. A taxonomic revision of genus Theobroma. *Contribution from the US National Herbarium*, **35**: 379-614.
- 58- Dade, H.A., 1928. Internal moulding of prepared cocoa. Department of Agriculture Gold Coast Year Book bull, **16**: 74–100.
- 59- Daguene, G., *et al.*, 1980. Essais de fermentation du cacao en Côte-d'Ivoire. Rapport CIRAD. Cité par Ravelomanana, Thèse de Doctorat, Montpellier, 1984.
- 60- Dall'Asta, C., Galaverna, G., Dossena A., Marchelli, R., 2004. Reversed-phase liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in wine. *Journal of Chromatographic A*, **1024**: 275-279.
- 61- De Brito, E.S., 2000. Structural and chemical changes in cocoa (Theobroma cacao L.) during fermentation, drying and roasting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**: 181-288.
- 62- Delage, N., d'Harlingue, A., Colonna Ceccaldi, B., Bompeix, G., 2003. Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wine. *Food control*, **14**: 225-227.
- 63- Despreaux, D., 1998. Le cacaoyer et la cacaoculture. Cacao et chocolat. Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires. Lavoisier Tech. Doc. Paris : pp 44-93.
- 64- D'Mello, J.P.F and MacDonald, A.M.C., 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, **69**: 155 - 156.
- 65- Domijan, A.M., Peraica, M., Miletic-Medved, M., Lucic, A., Fuchs, R., 2003. Two different clean-up procedures for liquid chromatographic determination of ochratoxin A in urine. *Journal of Chromatography B*, **798**: 317-321.
- 66- Edwards, S.G., O'Callaghan, J., Dobson, A.D.W., 2002. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycological Research*, **106**: 1005 – 1025.

- 67-Elmholt, S., Hestbjerg H., 1999. Field ecology of the ochratoxin A producing *Penicillium verrucosum*: survival and resource colonisation in soil. *Mycopathologia*, **147**: 67-81.
- 68-Engelhardt, G., Ruhland, M., Wallnöfer, PR., 1999. Metabolism of mycotoxins in plants. *Advanced Food Science*, **21**: 71-78.
- 69-Eskola, M., 2002. Study on trichothecenes, zearalenone and ochratoxin A in finnish cereals: occurrence and analytical techniques. *EELA Julkaisuja Publications*, **3**: 1-78.
- 70-Esteban, A., Abarca, M.L., Bragualat, M.R., Cabanes, F.J., 2006. Effect of water activity on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. *International Journal of food Microbiology*, **108**: 188-195.
- 71-Esteban, A., Abarca, M.L., Bragualat, M.R., Cabanes, F.J., 2004. Effect of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergillii. *Research in Microbiology*, **155**: 861-866.
- 72-European Commission, 1995. Task 3.2.2 “Assessment of Dietary Intake of ochratoxin A by the Population in EU Member States. Denmark.
- 73-FAO/WHO, 2001, fifty-sixth meeting: evaluation of certain mycotoxins that contaminate food. Geneva , Switzerland, 6-15 february 2001.
- 74-FEHD Report, 2006. LegCo Panel (9 may 2006) LegCo Panel on Food Safety and Environmental Hygiene (Hong Kong). <http://legco.gov.hk/yr05-06/english/panels/fseh/paper/fe0509cb2-1905-04-e.pdf>
- 75-Filténborg, O., Frisvard, J.C., Thrane, U., 1996. Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, **33**: 85 – 102.
- 76-Follmann, W., Hillebrand, I.E., Creppy, E.E., Bolt, H.M.,1995. Sister chromatid exchange frequency in cultured isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) treated with ochratoxin A and α . *Archive of Toxicology*, **69**: 280-286.
- 77-Freitas-Schawn, R., *et al.*, 1986. Charaterization and distribution of aerobic, spore-forming bacteria from cacao fermentations in Bahia. *Journal of Food Science*, **6**: 1583-1584.
- 78-Frisvad, J.C., Frank, J.M., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Samson, R.A., 2004. NewOchratoxinA producing species of *Aspergillus* section Circumdati. *Studies in Mycology*, **50**: 23–43.
- 79-Frisvad, J.C., Larsen, T.O., Vries R de, Meijer, M., Houbraken, J., Cabañes, F.J., Ehrlich, K., Samson, R.A. 2007. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. *Studies in Mycology*, **59**: 31-37.
- 80-Frisvad, J.C., Samson, J.C., 2000. Neopetromyces gen. Nov. And an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subgenus Circumdati. *Studies Mycol.*, **45**: 201-207.

- 81- Gams, W., Christensen, M., Onions, A.H.S., Pitt, J.I., Samson, R.A., 1985. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: Samson, R.A., Pitt, J.I., (Eds), *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. Plenum Press, New York, pp. 55-61.
- 82- Gauthier, B. *et al.*, 1977. Remarques sur la flore de levures de la fermentation traditionnelle du cacao en Côte-d'Ivoire. *Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires*, **6** : 160-163.
- 83- Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J., Samson, R.A., 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, **59**: 1-10.
- 84- Gerrit, H.D., Stegen, V.D., 2003. Enhancement of coffee quality by mould prevention. *Food Control*, **14**: 245-249.
- 85- Gilmour, M., Linblom, M., 2006. Management of ochratoxin A in in the cocoa supply chain. Summary of work by CABISCO/ECA/FCC Working Group on OTA. 15th *International Cocoa Research Conference*, San Jose, Costa Rica, 9-17 October 2006.
- 86- Gimeno A., 2000. Micotoxinas, introduction. XVII Congreso Centroamericano y del Caribe de Avicultura. <http://www.engormix.com>.
- 87- Gonzàlez, L., Juan, C., Soriano, J.M., Molto, J.C., Manes, J., 2006. Occurrence and daily intake of OTA of organic and non-organic rice and rice products. *International Journal of Food Microbiology*, **107**: 223-227.
- 88- Gonzàlez-Salgado, A., Patino, B., Vázquez, C., Gonzàlez-Jaén, M.T., 2005. Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section Nigri by PCR assays. *FEMS Microbiology Letters*, **245**: 353-361.
- 89- Grosso, F., Saïd, S., Mabrouk, I., Fremy, JM., Castegnaro, M., Jemmali, M., Dragacci, S., 2003. New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*, **41**: 1130-1140.
- 90- Guiraud, J.P., 1998. Microbiologie alimentaire. Technique et ingénierie. Série Agro-alimentaire. Dunod. Paris: 652 p
- 91- Hamari, Z., Kevei, F., Kovacs, E., Varga, J., Kozakiewicz, Z., Croft, J.H., 1997. Molecular and phenotypic characterization of *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* strains with special regard to their mitochondrial DNA polymorphisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **72** : 337-347.
- 92- Harris, J.P. and Mantle, P.G., 2001. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*, **58**: 709 – 716.
- 93- Haugland, R.A., Vesper, S., 2002. Method of identifying and quantifying specific fungi and bacteria. *US Patent*, **6** : 387-652.

- 94- Heenan, C.N., Shaw, K.J., Pitt, J.I., 1998. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* isolates and detection using coconut cream agar. *Journal of Food Mycology*, **1**: 67 – 72.
- 95- Hennig, A., Finks-gremmels, J., Leistner L., 1991. Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation, in mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours. *Bartsch H., Editor, IARC Scien. Publ. No. 115*: Lyon, France. pp 255-260.
- 96- Hermosa, M.R., Grondona, I., Iturriaga, E.A., Diaz-Minguez, J.M., Castro, C., Monte, E., Garcia-Acha, I., 2001. Development of a strain-specific SCAR marker for the detection of *Trichoderma atrovide* 11, A biological control agent against soilborne fungal plant pathogen. *Current Genetic*, **38** : 343-350.
- 97- Hirinkson, H.P., Hurst, S.F., Warnock, D.W., Morrinson, C., 2005. Assesment of ribosomal large subunit D1-D2 and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, **43** : 2092-2103.
- 98- Hocking, A.D., 1991. Isolation and identification of xerophilic fungi in stored commodities. In fungi and Mycotoxines in Stored Products. ACIAR Proceeding n° 36, Bangkok, Thailand. 23-26 April pp. 65-72.
- 99- Hocking, A.D., Pitt, J.I., 1980. Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low moisture foods. *Applied and Environmental Microbiology*, **39** : 488–492.
- 100- Hoffman ,Winston, 1987. Gene.
<http://www.fhcrc.org/labs/gottschling:yeast/qgpre.html>.
- 101- Höhler, D., 1998. Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, **37**: 2–12.
- 102- Hymery, N., Sibril, Y., Parent-Massin, D., 2006. In vitro effects of trichothecenes on human dendritic cells. *Toxicology*, **20**: 899-909.
- 103- IARC (International Agency Research of Cancer), 1993. Ochratoxin A. some naturally occuring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans. Lyon: IARC Press, **56**: 489-521
- 104- Iavicoli, I., Brera, C., Carelli, G., Caputi, R., Marinaccio, A., Miraglia, M., 2002. External and internal dose in subjects occupationally exposed to ochratoxin A. *International Archive Occupationally Environment Health*, **75**: 381-386.
- 105- ICCO, 2008. *Quarterly bulletin of cocoa statistics, Vol XXXIV, n°2, cocoa year 2007/2008*. <http://www.icco.org/statistics/production.aspx>, posted 30 june 2008.
- 106- Jacquet, M., Vincent, J-C., Hahn, J., Lotode, R., 1980. Le séchage artificiel des fèves de cacao. *Café, Cacao Thé, XXIV*, **1** :43-56.

- 107- Jespersen, L., Nielsen, D.S., Hønholt, S., Jakobsen, M., 2005. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Research*, **5**: 441–453.
- 108- Jiménez, A.M., Lopez de Cerain, A., González-penas, E., Bello, J., 1999. A high-performance liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in human plasma. *Chromatographia*, **50**: 457-469.
- 109- Jinap, S., Kamaruddin, S., Radiah, O., 1993. Changes in some physico-chemical properties of cocoa beans during maturation. *ASEAN Food Journal*, **4**: 134-138.
- 110- Jinap, S., 1994. Organic acids in cocoa beans. *ASEAN Food Journal*, **1**: 3-12.
- 111- Jorgensen, K., 1998. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for Ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, **15**: 550–554.
- 112- Jorgensen, K., Jacobsen, J.S., 2002. Occurrence of ochratoxin A in Danish wheat and rye. *Food Additives and Contaminants*, **19**: 1184-1189.
- 113- Kaniou-Grigoriadou, I., Eleftheriadou, A., Mouratidou, T., Katikou, P., 2005. Determination of aflatoxin M1 in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese. *Food control*, **16**: 257-261.
- 114- Kevei, F., Hamari, Z., Varga, J., Kozakiewicz, Z., Croft, J.H., 1996. Molecular polymorphism and phenotypic variation in *Aspergillus carbonarius*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**: 59–66.
- 115- Kokkonen, M., Jestoi, M., Rizzo, A., 2005. The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, **99**: 207-214.
- 116- Kozakiewicz, Z., 1989. *Aspergillus* species on stored products. *Mycological Papers*, **161**: 1-188.
- 117- Kuiper-Goodman, T., 1996. Risk assessment of ochratoxin A: an update. *Food Additives and Contaminants*, **13**: 535–557.
- 118- Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M., 1989. Risk assessment of the mycotoxin OchratoxinA. *Biometrics Biomedical and Environmental Sciences*, **2**: 179–248.
- 119- Kusters-Van Someren, M.A., Samson, R.A., Visser, J., 1991. The use of RFLP analysis in classification of the black *Aspergilli*. Reinterpretation of *Aspergillus niger* aggregate. *Current Genetics*, **19**: 21-26.
- 120- Krogh, P., 1987. Ochratoxins in food, In: P. Krogh: Mycotoxins in Food. *Academic Press*, pp 97-121.
- 121- Lagunes-Gálvez, S.G., 2002. Isolement et caractérisation de bactéries acétiques provenant de la fermentation du cacao. DEA, Ecole Doctorale Science et procédé biologiques et Industriels. Université de Montpellier II, Montpellier 34p.

-
- 122- Lagunes-Gálvez, S., Loiseau, G., Paredes, J.L., Barel, M., Guiraud, J.P., 2005. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, **114**: 124–130.
- 123- Lai, M., Semeniuk, G., Hesseltine, C.W., 1970. Conditions for production of ochratoxin A by *Aspergillus* species in a synthetic medium. *Applied Microbiology*, **18** : 542-544.
- 124- Lanaud, C., Montamayor, J.C., Sounigo, O., 1999. “Le cacaoyer”. In: Maon, P., Perner, X., Glaszmann, J. Ed. CIRAD. Diversité génétique des plantes tropicales cultivées. Paris, 56 p.
- 125- Larsen, T.O., Svendsen, A., Smedsgaard, J., 2001. Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *penicillium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 3630-3635.
- 126- Lee, HB, Magan, N., 1999. Environment factors influence in vitro interspecific interactions between *A. ochraceus* and other maize spoilage fungi growth and ochratoxin production. *Mycopathologia*, **146**: 43-47.
- 127- Le-Bars, J., 1988. Toxinogénèse en fonction des conditions écologiques du système grains/microorganismes, dans Conservation et Stockage des grains et graines, et produits dérivés. *Multon J.L., Editor, Technique et Documentation Lavoisier* : Paris, France, pp. 376 – 391.
- 128- Leblanc, J.C., 2004. Étude de l'alimentation totale française. Mycotoxines, minéraux et éléments traces. INRA, 68 p.
- 129- Lehrian, D.W., Patterson, G.R., 1984. Cocoa fermentation. *Biotechnology*, **5** : 519–575.
- 130- Li, S., Marquardt, R.R., Frohlich, A.A., Vitti, T.G., Crow, G., 1997. Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicology and Applied pharmacology*, **145**: 82-90.
- 131- Lombaert, G.A., Pellaers, P., Neumann, G., Kitchen, D., Huzel, V., Trelka, R., Kotello, S., Scott, P.M., 2004., Ochratoxin A in dried vine fruits on the Canadian retail market. *Food Additives and Contaminants*, **17** : 61-69.
- 132- Lopez, M.M., Freitas, G., Boiron, P., 2000. Potential utility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and restriction endonuclease assay (REA) as typing systems for *Madurella mycetomatis*. *Current Microbiology*, **40** (1): 1 – 5.
- 133- Lopez de Cerain., González-penas, E., Jiménez, A.M., Bello, J., 2002. Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. *Food Additives and Contaminants*, **19**, 1058–1064.
- 134- Magan, N., Hope, R., Cairns, V., Aldred D., 2003. Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology*, **109** : 723-730.

- 135- Magan, N., Aldred, D., 2005. Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. *Food Additives and Contaminants*, **10** : 10-16.
- 136- Manolova, Y., Manolov, G. Parvanova, L., Petkovabocharova, T., Castegnaro, M., Chernozemsky, I.N., 1990, Induction of characteristic chromosomal-aberrations, particularly X-Trisomy, in cultured Human-lymphocytes treated by ochratoxin A, a mycotoxin implicated in Balkan endemic Nephropathy. *Mutation research*, **231** : 143-149.
- 137- Mantle, P.G., McHugh, K.M., 1993. Nephrotoxic fungi in foods from nephropathy households in Bulgaria. *Mycological Research*, **97** : 205–212.
- 138- Markovic, B. 1985. Néphropathie des Balkans et carcinomes à cellules transitionnelles. *Journal Urologie*, **91**: 215-220.
- 139- Marquardt, R.R., Frohlich, A.A., 1992. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *Journal of Animal Science* , **70**: 3968-3988.
- 140- Marvalhas, M., 1966. Mycological deterioration of cocoa beans during fermentation and storage in Bahia. *International Chocolate Review*, **21**: 375–378.
- 141- Micco, C., Grossi, M., Miraglia, M., Brera, C., 1989. A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. *Food Additives and Contaminants*, **6** : 333–339.
- 142- MINADER (Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural), DESA, 2008. Rapport Trimestriel DESA/MINADER, Cameroun, 2008, 30p.
- 143- Miraglia, M., Brera, C., 2002. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states, Reports on tasks for scientific cooperation, task 3.2.7, 69-86. Publisher: SCOOP Directorate-General Health and Consumer Protection http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf.
- 144- Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D., Magan N., 2004. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *A. carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel, *Journal of Applied Microbiology*, **97**: 439-445.
- 145- Molot B., 2003. maîtrise des teneurs en OTA dans les vins : Quelles recommandations ? ITV France Nîme/ Rodilhan.
- 146- Morrin, O., Haloun, A., Treilhaud, M., Sagan, C., Boiron, P., 1999. Systemic mycosis due *Pseudallescheria boydii* in a double transplant patient with a cystic fibrosis. Study of isolated strains with RAPD (random amplification of polymorphic DNA). *Journal de Mycologie Médicale*, **9** : 119 – 123.
- 147- Mossu, G., 1990. Le cacaoyer. *Editions Maisonneuve et Larousse*. p 159.
- 148- Murakami, H., 1976a. A brief history of classification of the black aspergilli including the Kuro-koji molds. Taxonomic studies on Japanese industrial strains of the *Aspergillus* (Part 24). *Journal of the Society of Brewing, Japan* **71**: 952–956.

- 149- Murakami, H., 1976b. Origin of strain of the black aspergilli. Taxonomic studies on Japanese industrial strains of the *Aspergillus* (Part 25). *Journal of the Society of Brewing*, **71**: 956–959.
- 150- Murakami, H., 1979a. Some experimental methods and cultural characteristics of the black aspergilli. Taxonomic studies on Japanese Industrial strains of the *Aspergillus* (Part 26). *Journal of the Society of Brewing*, **74**: 323–327.
- 151- Murakami, H., 1979b. Clustering of strains belonging to the black aspergilli by multivariate analysis. Taxonomic studies on Japanese Industrial strains of the *Aspergillus* (Part 31). *Journal of the Society of Brewing*, **74**: 842–848.
- 152- Murakami, H., 1979c. Classification system of the black aspergilli. Taxonomic studies on Japanese Industrial strains of the *Aspergillus* (Part 32). *Journal of the Society of Brewing*, **74**: 849–853.
- 153- Murakami, H., 1979d. Summary and description of species of the black aspergilli. Taxonomic studies on Japanese Industrial strains of the *Aspergillus* (Part 33). *Journal of the Society of Brewing*, **74**: 854–858.
- 154- Murakami, H., Noro, F., (1979). Selection of representative strains of the black aspergilli. Taxonomic studies on Japanese Industrial strains of the *Aspergillus* (Part 29). *Journal of the Society of Brewing*, **74**: 462–465.
- 155- Murakami, H., Yoshida, K., 1979a. Grading of morphological characters of the black aspergilli. Taxonomic studies on Japanese Industrial strains of the *Aspergillus* (Part 27). *Journal of the Society of Brewing*, **74**: 328–331.
- 156- Murakami, H., Yoshida, K., 1979b. Grading of physiological characters of the black aspergilli. Taxonomic studies on Japanese Industrial strains of the *Aspergillus* (Part 28). *Journal of the Society of Brewing*, **74**: 459–461.
- 157- Murakami, H., Yoshida, K., Yoshida, K., Noro, F., 1979. Tables of mycological characters of the representative strains of the black aspergilli. Taxonomic studies on Japanese industrial strains of the *Aspergillus* (Part 30). *Journal of the Society of Brewing*, **74**: 466–470.
- 158- Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C., Bryant, C.M., 2006. *Food Mycotoxins: An Update*. *J. Food Sci.*, **71**: R51-R65.
- 159- Nakajima, M., Tsubouchi, H., Miyabe, M., Ueno, Y., 1997. Survey of aflatoxin B1 and Ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. *Food and Agricultural Immunology*, **9** : 77–83.
- 160- Nielsen, D.S., Hønholt, S., Tano-Debrah, K., Jespersen, L., 2005. Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast*, **22** : 271–284.

- 161- Nielsen, D.S., Teniola, O.D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T., Holzapfel, W.H., 2007. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture dependent and culture independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, **114** : 168–186.
- 162- OFFEM, J.O., 1990. Individual variation in the amino acid and chemical composition of defatted cocoa bean meal of three varieties of cocoa (*Theobroma cacao*) from South-eastern Nigeria. *Journal of the Science Food and Agriculture*, **52** :129-135.
- 163- OMS, 1990. Selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot. International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria, 105 p.
- 164- Ostovar, K., Kenney, G., 1973. Isolation and characterization of microorganisms involved in the fermentation of Trinidad's cococ beans. *Journal of Food Science*, **4** : 611-617.
- 165- Ottener, H., Majerus, P., 2001. Ochratoxin A (OTA) in coffee: nation-wide evaluation of data collected by German Food Control 1995-1999. *Food Additives and Contaminants*, **18** : 431-435.
- 166- Parenicova, L., Skuboe, P., Frisvad, J., Samson, R.A., Roseen, L., Ten Hoor-Suykerbuyk, M., Visser, J., 2001. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 521-527.
- 167- Parenicova, L., Skouboe, P., Samson, R.A., Rossen, L., Visser, J., 2000. Molecular tools for the classification of black aspergilli. In: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. (Samson RA, Pitt JI, eds). Amsterdam: Harwood Academic Publishers: pp 413–424.
- 168- Pardo, A., Marin, S., Sanchis, V., Ramos, AJ., 2005. Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *A. ochraceus* isolates on grapes. *Food microbiology*, **22**: 383-389.
- 169- Park, L., Boutrif, E., 1999. Minimiser les risques associés aux mycotoxines, à l'aide du concept HACCP. In *Troisième Conférence Internationale Mixte FAO/OMS/PNU* *sur les mycotoxines*, Tunis, Tunisie : 3-6 mars, pp. 1-12.
- 170- Pascale, M., Solfrizzo, M., De Girolamo, A. Visconti, A., 2000. Determination of mycotoxins in foods and beverages by means of immunoaffinity columns and high-performance liquid chromatography. *Bulletin Institutional Compr. Agricultural Science of kinki University*, **8**: 39-50.
- 171- Passos, F.M.L. *et al.*, 1984. Characterization and distribution of lactic acids bacteria from traditional cocoa bean fermentations in Bahia. *Journal of Food Science*, **12** : 205-208.
- 172- Peraica M., Radic B., Lucic A., Pavlovic M., 2000. Efectos toxicos de las micotoxinas en el ser humano. *Boletin de la Organizacion Mundial de la Salud, recopilacion de articulos*, **2** : 80-92.

- 173- Perrone, G., Mule, G., Susca, A., Battilani, P., Pietri, A., Logrieco, A., 2006a. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 680–685.
- 174- Perrone, G., Susca, A., Epifani, F., Mule, G., 2006b. AFLP characterization of Southern Europe population of *Aspergillus* Section *Nigri* from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, **111** : S22–S27.
- 175- Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J.C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Samson, R.A., 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology*, **59** : 53-66.
- 176- Perrone, G., Susca, A., Stea, G., Mule, G., 2004. PCR assay for identification of *A. carbonarius* and *A. japonicus*. *European Journal of Plant Pathology*, **88** : 107-112.
- 177- Petzinger, E., Weidenbach, A., 2002. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livestock Production Science*, **76**: 245-250.
- 178- Petzinger, E., Ziegler, K., 2000. Ochratoxin A from a toxicological perspective. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **23** : 91-98.
- 179- Pfohl-Leszkowicz, A., Castegnaro, M., 1999. L'ochratoxine A, In : les Mycotoxines dans l'alimentation : évolution et gestion des risques. Pfohl-Leszkowicz A., Editor, Lavoisier : Paris, France, pp 249 – 277.
- 180- Pfohl-Leszkowicz, A., Chakor, K., Creppy, E.E., Dirheimer, G., 1991, DNA adduct formation in mice treated with ochratoxin A, in mycotoxins, Endemic Nephropathy and urinary tract tumours. Bartsch H., editor IARC Scien. Publ. No. **115**: Lyon, France, pp 245-253.
- 181- Phong Dao, H., Mathieu, F., Lebrihi, A., 2005. Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method. *International Journal of Food Microbiology*, **104**: 61-67.
- 182- Pitt, J.I., 1991. *Penicillium* toxins. In fungi and mycotoxins in stored products. *ACIAR proceedings* No. **36** : Bangkok, Thailand , 23-26 April, pp. 99-103.
- 183- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 1997. Fungi and food spoilage. In: Blackie Academic and Professional, London.
- 184- Pitt, J.I., Basilico, J.C., Abarca, M.L., Lopez C., 2000. Mycotoxins and toxinogenic fungi. *Medical Mycology*, **38** : 41-46.
- 185- Pontillon, J., 1997. Cacao et chocolat : production, utilisation et caractéristiques. *Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires*, Editions Lavoisier, 638 p.
- 186- Raper, K.B., Fennell, D.I., 1965. The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore.

- 187- Ratters, M., Matissek, R., 2000. Ochratoxin A in cocoa and human health aspects. *13th Intl. Cocoa Research Conf.*, Kota Kinabalu, Sarba, Malaysia, pp 1429-1438, 9-14 October 2000.
- 188- Ravelomanana, R. *et al.*, 1984. Etude de la flore de levures de la fermentation traditionnelle du cacao à Madagascar. *Revue des fermentations et Actes des Industries Alimentaires*, **4** : 103-106.
- 189- Règlement (CE) n° 472/2002, 12 mars 2002. Journal Officiel des Communautés Européennes L75, 18–20.
- 190- Ribeiro, J.M.M., Cavaglieri, L.R., Fraga, M.E., Direito, G.M., Dalcero, A.M., Rosa, C.A.R., 2006. Influence of water activity, temperature and time on mycotoxins production on barley rootlets. *Letters in Applied Microbiology*, **42**: 179-184.
- 191- Ringot, D., Chango, A., Scheneider, YJ., Larondelle, Y., 2006. Toxicokinetics and toxicodynamics o ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions*, **159**: 18-46.
- 192- Rinyu, E., Varga, J., Ferenczy L., 1995. Phenotypic and genotypic analysis of variability in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, **33** : 2567-2575.
- 193- Rizzo, A., Eskola, M., Atroshi, F., 2002. Ochratoxin A in cereals, foodstuffs and human plasma. *European Journal of Plant Pathology*, **108** : 631–637.
- 194- Roelofsen, P.A., 1953. Fermentation, drying and storage of cocoa beans. *Advance in Food Research*, **8** : 225–296.
- 195- Rohan, T.A., 1961. New methods for the large-scale fermentation of cocoa. *Scientific and Technical Surveys*, **38** :13-17.
- 196- Romani, S., Pinnavaia, G.G., Dalla Rosa, M., 2003. Influence of roasting levels on ochratoxin A content in coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 5168 – 5171.
- 197- Rosa, C.A.R., Magnoli, C.E., Fraga, M.E., Dalcero, A.M., Santana, D.M.N., 2004. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, **21** : 358-364.
- 198- Samson, R.A., 1991. Identification of food –borne *Penicillium*, *Aspergillus* and *Fusarium* species. In ACIAR proceedings No 36, Bangkok, Thailand, 23-26 April pp. 39-45.
- 199- Samson, R.A., 1992. Current taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and teleomorphs. In: *Bennet, J.W., Klich, M.A. (Eds), Aspergillus : Biology and Industrial Applications*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 355-3909.

-
- 200- Samson, R.A., Houbroken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Frank, J.M., Frisvad, J.C., 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri. *Studies in Mycology*, **50** : 45-61.
- 201- Samson, R.A., Noonim, P., Meijer, M., Houbroken, Frisvad, J.C., Varga, J., 2007. Diagnostic tools to identify black aspergillii. *Studies in mycology*, **59** : 129-145.
- 202- Sanger, F., Nicklen, S. And Coulson, A.R., 1977. Sequencing with chain terminated inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463-5467.
- 203- SCF, 1998. Opinion of the Scientific Committee for Food on OTA expressed on 17 Sep 1998. http://www.europe.eu.in/contam/food/fs/sc/scf/out14_en.hlm.
- 204- Schmidt, H., Taniwaki, M.H., Vogel, R.F., Niessen, L., 2004. Utilization of AFLP markers for PCR-based identification of *Aspergillus carbonarius* and indication of its presence in green coffee samples. *Journal of Applied Microbiology* **97**: 899–909.
- 205- Schwan, R.F., Wheals, A.E., 2004. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, **44** : 205–221.
- 206- Scott, P.M., 1994. Mycotoxins in grain. Compounds other than aflatoxins. *Phytopathology*, **2238**: 261-507.
- 207- Scudamore, K. A., Patel, S., 2000. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. *Food Additives and Contaminants*, **17** : 407-416.
- 208- Serra Bonvehi, J., 2004. Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 6347-6352.
- 209- Serra, R., Cabanes, F.J., Perrone, G., Castella, G., Venancio, A., Mule, G., Kozakiewicz, Z., 2006. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. *Mycologia* **98**: 295–306.
- 210- Serra, R., Mendonça, C., Abrunhosa, L., Pietri, A., Venâncio, A., 2004. Determination of ochratoxin A in wine grapes : comparaison of extraction procedures and method validation. *Analytica Chimica Acta*, **513** : 41-47.
- 211- Shahidi, F., Naczki, N., 1995. Food phenolics: Sources chemistry effects application. *Technomic Publishing Company*, Lancaster, Pennesylvania, 331 p.
- 212- Skaug, M.A., 1999. Analysis of Norwegian milk and infant formulas for Ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, **16** : 75–78.
- 213- Soliman, K. M., 2002. Incidence, level and behaviour of aflatoxins during coffee bean roasting and decaffeination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50** : 7477 - 7481.
- 214- Spiller, G.A., 1998. Caffeine. *CRC Press LLC*, New York, 373 p.

- 215- Stander, M.A., Bornscheuer UT., Henke E., Steyn PS., 2000a. Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **48** : 5736-5739.
- 216- Stander, MA., Steyn, PS., Lübben, A., Mijkovic, A., Mantle, P.G., Marais GJ., 2000b. Influence of halogen salts on the production of the ochratoxins by *Aspergillus ochraceus* wilh. *Journal of Agricultural and food chemistry*, **48**: 1865-1871.
- 217- Steyn, P.S., 1993. Ochratoxin A: its chemistry, conformation and biosynthesis. INSERM/John Libbey Eurotext, **231**: 51-58.
- 218- Studer-Rohr, I., Dietrich, D.R., Schlatter, J., Schlatter, C., 1995. The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Food and Chemical Toxicology*, **33** : 341–355.
- 219- Suárez-Quiroz, M.L., González-Rios, O, Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., Guiraud, JP., 2004. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. *Food Microbiology*, **21**: 629-634.
- 220- Suárez-Quiroz, M., González-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., Guiraud, J.P., 2004. Study of Ochratoxin A-producing strains in coffee processing. *Journal of Food Science and Technology*, **39** : 501–507.
- 221- Suárez-Quiroz, M., González-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., Guiraud, J.P., 2005. Effect of post-harvest processing procedure on OTA occurrence in artificially contaminated coffee. *International Journal of Food Microbiology*, **103** : 339-345.
- 222- Susca, A., Stea, G., Mule, G., Perrone, G., 2007. Polymerase chain reaction (PCR) identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* based on the calmodulin gene. *Food additives and Contaminant*, **24** : 1154-1160.
- 223- Tangni, E.K., Ponchaut, S., Maudoux, M., Rozenberg, R., Larondelle, Y., 2002. Ochratoxin A in domestic and imported beers in Belgium : occurrence and exposure assessment. *Food Additives and Contaminants*, **19** : 1169-1179.
- 224- Taniwaki, M.H., Pitt, J.I., Urbano, G.R., Texeira, A.A., Leitao, M.F., 1999. Fungi producing ochratoxin A. In *18th ASIC coffee Conference*, Helsinki, Finland.
- 225- Taniwaki, M.H., Urbano, G.R., Palacios, H.A.C., Leitao, M.F.F., Menezes, H.C., Vicentini, M.C., Iamanaka, B.T., Taniwaki, N.N., 2001. Influence of water activity on mould growth and ochratoxin A production in coffee. In *19th ASIC Coffee Conference*, Trieste, Italy, 14-18 may.
- 226- Taniwaki, M.H., Pitt, J.I., Texeira, Iamanaka, B.T., 2003. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology*, **82** : 173-179.
- 227- Taylor, J.W., Geiser, D.M., Burst, A., Koufopanou, V., 1999. The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strainotyping. *Clinical Microbiology Reviews*, **12** : 126-130.

- 228- Teren, J., Varga, J., Hamari, Z., Rinyu, E., Kevei, F., 1996. Immunochemical detection of Ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*, **134** : 171-176.
- 229- Thirumala-Devi, K., Mayo, M.A., Reddy, G., Emmanuel, K.E., Larondelle, Y., Reddy, D.V.R., 2001. Occurrence of Ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India. *Food Additives and Contaminants*, **18** : 830-835.
- 230- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. Clustal W., 1994. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**: 4673-4680.
- 231- Thompson, S.S., Miller, K.B., Lopez, A.S., 2001. Cocoa and coffee. *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* DC 721-736.
- 232- Timbie, D., Sechrist, L., Keeney, P., 1978. Application of high pressure liquid chromatography to the study of variables affecting theobromine and caffeine concentrations in cocoa beans. *Journal of Food Science*, **43**: pp 560
- 233- Tournas, V., Stack, M.E., Mislivec, P.V., Koch, H.A., Bandler, R., 2001. Bacteriological Analytical Manual Online. US Food & Drug Administration (<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-18.html>).
- 234- Valenta, H., 1998. Chromatographic methods for determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *Journal of Chromatography*, **815**: 75-92.
- 235- Van Egmond, H.P., 1999. Worldwide regulation of ochratoxin A. *IARC Sci. Publ.* **115**, 331-336.
- 236- Varga, J., Kevei, F., Debets, F., Kozakiewicz, Z., Croft, J.H., 1994. Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms in field isolates of the *Aspergillus niger* aggregate. *Canadian Journal of Microbiology*, **40** : 612-621.
- 237- Varga, J., Kevei, F., Fekete, C., Coenen, A., Kozakiewicz, Z., Croft, J.H., 1993. Restriction fragment length polymorphisms in the mitochondrial DNAs of the *Aspergillus niger* aggregate. *Mycological Research*, **97** : 1207-1212.
- 238- Varga, J., Kevei, F., Rinyu, F., Téren, J., Kozakiewicz, Z., 1996. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, **62** : 4461-4464.
- 239- Varga, J., Kevei, F., Hamari, Z., Tóth, B., Téren, J., Croft, J.H., Kozakiewicz, Z., 2000. Genotypic and phenotypic variability among black aspergilli. In: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. (Samson RA, Pitt JJ, eds). Amsterdam: Harwood Academic Publishers: pp 397-411.
- 240- Varga, J., Kocsubé, S., Toth, B., Frisvad, J.C., Perrone, G., Susca, A., Meijer, M., Samson, R.A., 2007. *Aspergillus brasiliensis* sp. Nov., a biserial black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57** : 1925-1932.

- 241- Varga, J., Rigo, K., Kocsubé, S., Farkas, B., Pál, K., 2003. Diversity of polyketide synthase gene sequences in *Aspergillus* species. *Research in Microbiology*, **154** : 593-600.
- 242- Vries, R.P de, Frisvad, J.C., van de Vondervoort, P.J.I., Burgers K, Kuijpers, A.F.A., Samson, R.A., Visser. J., 2005. *Aspergillus vadensis*, a new species of the group of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, **87**: 195–203.
- 243- Villeneuve, F., Cros, E., Vincent, J-C., Macheix J.J., 1982. Recherche d'un indice de fermentation du cacao. Evolution des flavan-3-ols de la fève. *Café Cacao Thé*, XXXIII, **2** :165-170.
- 244- WHO (World Health Organization), 1996. Evaluation of certain food additives and contaminants. *44th Report of JECFA; WHO Technical Report series 859; WHO*: Geneva, Switzerland.
- 245- Wood and Lass, 1985. Cocoa. *Longman Scientific & Technical*. Fourth edition, 620 p.
- 246- Wilkens, J., Jörissen, U., 1999. Degradation of ochratoxin A during manufacture of roasted coffee. In *21st Mycotoxin workshop, jena, BgVV*. June 7–9, 1999.
- 247- Wright, H., 1999. Genetic diversity and relationship of cacao (*Theobroma cacao* L.) in southern Mexico. *Theoretical and Applied Genetics*, **96** : 621-627.
- 248- Xiao, H., Madhyastha, S., Marquardt, R.R., Li, S., Vodela, J.K., Frohlich, A.A., Kemppainen, W., 1996. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **137** : 182-192.
- 249- Yu, F., Zhu, X., Du, L., 2005. Developing a genetic system for fonctional manipulation of FUM1, a polyketide synthase gene for the biosynthesis of fumonisins in *Fusarium verticillioides*. *FEMS Microbiology Letters*, **248** : 257-264.
- 250- Zimmerli, B., Dick, R., 1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants*, **13**: 665-668.

ANNEXES

ANNEXES

ANNEXE 1 : Procédure de dosage de l'OTA dans les fèves de cacao

(référence : laboratoire d'analyses des mycotoxines des produits tropicaux du CIRAD : version 02)

1- PRINCIPE

OTA est extraite des fèves de cacao broyées (avec la coque) par un mélange acétonitrile/eau (60/40). L'extrait est purifié sur une colonne d'immunoaffinité. OTA est séparée et identifiée par HPLC et quantifiée par spectrofluorescence.

Précaution

OTA est néphrotoxique, toxique pour le foie et présente des propriétés immunodépresseurs. Les gants et les lunettes doivent être portés lors des expérimentations.

2- REACTIFS

Seuls les réactifs de qualité analytique peuvent être utilisés lors de ce dosage

2-1- Les solutions d'étalonnage sont préparées à partir d'une solution étalon à 200 ng/ml (CF protocole 4.1).

2-2- Méthanol (qualité HPLC).

2-3- NaCl (qualité analytique)

2-4- Tween 20

2-5- Tampon phosphate (PBS).

2-6- Acétonitrile (qualité HPLC).

2-7- Acide acétique glacial. (Qualité analytique).

2-8- Réactif d'élution pour la colonne d'immunoaffinité.

Méthanol (2.2).

2-9- Phase mobile HPLC.

Préparer le mélange eau distillée 51 %, acétonitrile 48 % (2.7) et acide acétique glacial 1% (2.8).

2-10- Solution de dilution pour les standards. (Méthanol+eau, 3+7)

Préparer le mélange méthanol (2.2) 30 % et eau distillée 70 %.

3- PROTOCOLE D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION

3-1- Extraction.

50 g de poudre sont extraits pendant 30 min par 200 mL du mélange acétonitrile / eau 60/40 en présence de 4 g de NaCl avec un agitateur mécanique.

L'extrait est ensuite filtré ou centrifugé (4°C).

Filtrer l'extrait sur celite sous vide et récupérer environ 25 ml de l'extrait filtré.

3-2- Purification

4 mL de l'extrait sont mixés à 44 mL de PBS.

Avant addition de l'extrait, ajouter 48 µL de tween 20 aux 44 mL de PBS.

Conditionner la colonne d'immunoaffinité avec 10 ml de PBS. Ajouter l'extrait dilué dans le réservoir et régler le débit à 2 mL/min maxi (soit environ 1 goutte/s) sur la colonne. Rincer la colonne par 2 fois avec 10 ml de PBS. Enlever le réservoir et placer un flacon silanisé de réception. Eluer

la colonne avec (2+1)* ml de méthanol à 1 goutte/s. Faire remonter le solvant par aspiration avec une seringue lors de l'élution.

Evaporer à sec (70°C) les 3 ml sous courant d'azote, puis reprendre par 1 ml d'eau.

** Eluer la colonne avec 2 ml de méthanol une première fois, puis ajouter 1 ml. Recueillir les éluats dans le même flacon. Purger en final la colonne avec de l'air pour récupérer les dernières gouttes de méthanol.*

4- DETERMINATION PAR HPLC

4-1- Courbe d'étalonnage.

Elle est préparée à partir de solutions témoins de concentration connue. Les solutions témoins sont préparées à partir d'une solution à 200 ng/ml. Cette dernière solution est préparée à partir d'une solution commerciale avec une dilution adaptée par le mélange (méthanol+eau, 3+7).

Solutions étalons ST :

	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5
µl méthanol+eau (3+7,v+v)	9987.5	9975	9950	9875	9750
µl 200ng/ml OTA	12.5	25	50	125	250
Conc. OTA ng/ml	0.25	0.50	1.0	2.5	5.0

La courbe d'étalonnage doit être refaite lorsque les conditions chromatographiques changent (solvant d'élution, colonne etc).

4-2- Conditions opératoires.

4-2-1 Boucle d'injection de 100 µl.

4-2-2 Débit isocratique de 1 ml/min. Solvant d'élution : mélange eau distillée 51 %, acétonitrile 48 % (2.10) et acide acétique glacial 1% (2.11).

4-2-3 Colonne HPLC phase inverse C18, ODS de 1 à 5 µm avec précolonne, thermostatée à 35°C. Pression : de l'ordre de 95 –105 Bar.

4-2-4 Détecteur spectrofluorimètre.

λ excitation = 333 nm

λ émission = 460 nm

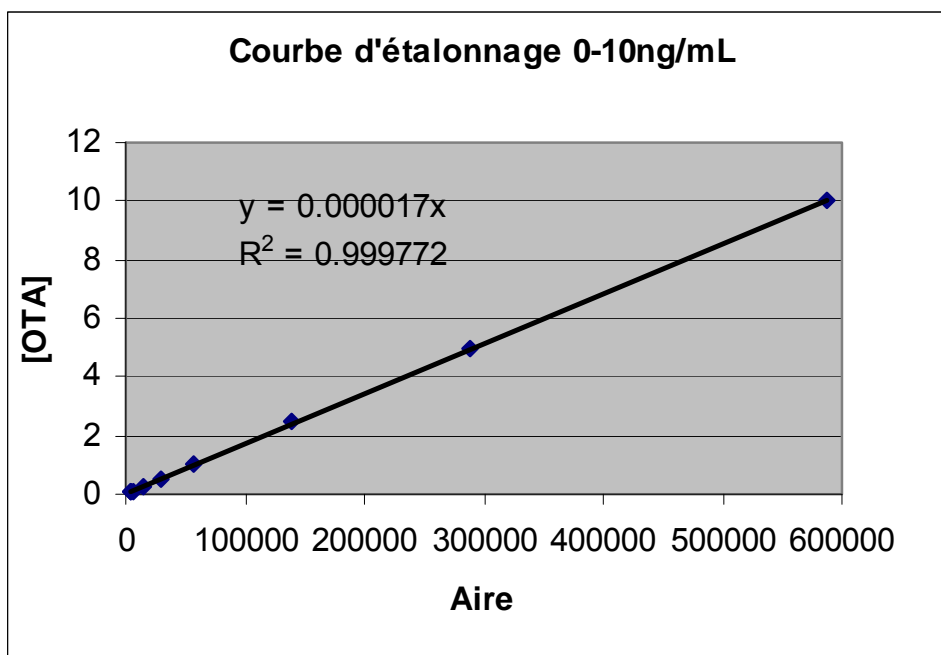
4-2-5 Intégrateur.

4-2-6 OTA : temps de rétention environ 13.3 – 13.5 min.

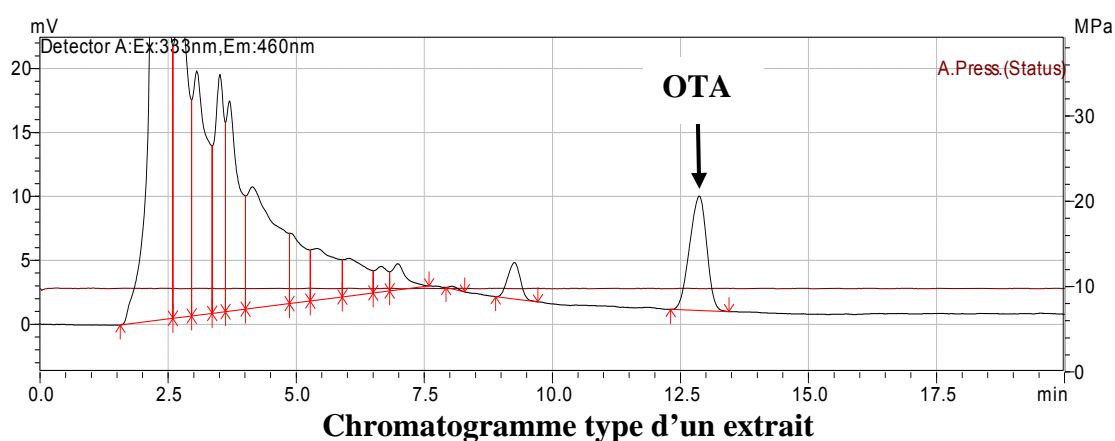
4-3- Résultats.

Les résultats sont calculés par rapport à la droite d'étalonnage et exprimés en µg/kg avec une décimale. Tenir compte des dilutions possibles.

COURBE D'ÉTALONNAGE TYPE



CHROMATOGRAMME TYPE



Annexe 2 : Préparation des enceintes et des milieux de culture à différentes activités de l'eau

- Préparation des milieux de culture

Aw	0,70	0,75	0,80	0,85	0,90	0,95	0,99
Gélose (g)	22,5	22,5	22,5	22,5	22,5	22,5	22,5
Glycérol (mL)	320	290	275	225	175	100	0
Eau (mL)	450	450	450	450	450	450	450

- Préparation des enceintes (mL)

Aw	0,70	0,75	0,80	0,85	0,90	0,95	0,99
Glycérol (mL)	320	290	275	225	175	100	50
Eau (mL)	180	210	225	275	325	400	450

Annexe 3 : Etude de la production d'OTA sur plusieurs milieux de culture

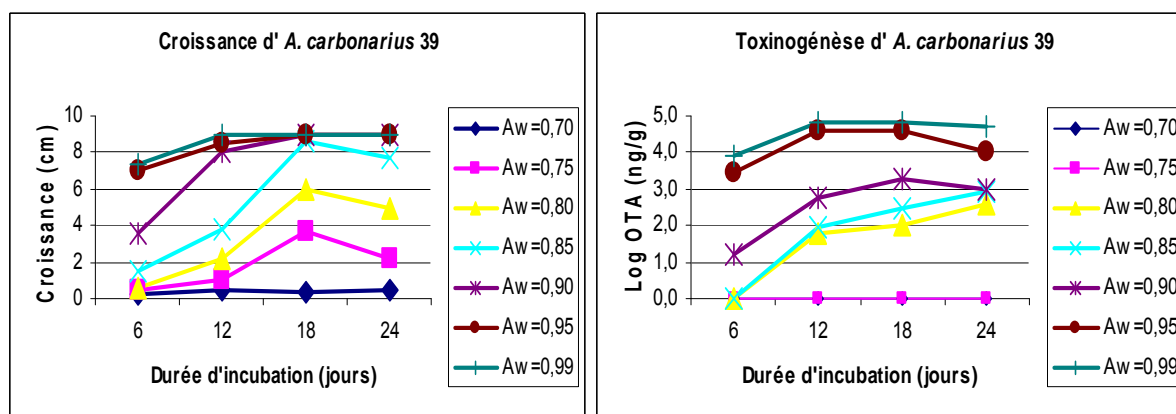
Codes des A. <i>niger agg</i>	Production d'OTA (ng.g ⁻¹)				
	PDA (ng.g ⁻¹)	CYA	Czapeck agar	MEA	DG 18
13	13,4 ± 1,1	nd	nd	nd	nd
17	8,2 ± 0,9	nd	nd	nd	nd
18	nd	nd	nd	nd	nd
20	nd	nd	nd	nd	nd
22	nd	nd	nd	nd	nd
24	6,4 ± 0,8	nd	nd	nd	nd
25	nd	nd	nd	nd	nd
26	nd	nd	nd	nd	nd
27	nd	nd	nd	nd	nd
28	nd	nd	nd	nd	nd
29	nd	nd	nd	nd	nd
30	nd	nd	nd	nd	nd
31	nd	nd	nd	nd	nd
33	nd	nd	nd	nd	nd
34	nd	nd	nd	nd	nd
35	nd	nd	nd	nd	nd
37	nd	nd	nd	nd	nd
40	nd	nd	nd	nd	nd
42	nd	nd	nd	nd	nd
45	nd	nd	nd	nd	nd
46	nd	nd	nd	nd	nd
49	nd	nd	nd	nd	nd
50	nd	nd	nd	nd	nd
52	nd	nd	nd	nd	nd
54	nd	nd	nd	nd	nd
55	nd	nd	nd	nd	nd
56	nd	nd	nd	nd	nd
57	nd	nd	nd	nd	nd
58	nd	nd	nd	nd	nd
59	nd	nd	nd	nd	nd
60	nd	nd	nd	nd	nd
61	nd	nd	nd	nd	nd
62	nd	nd	nd	nd	nd
63	nd	nd	nd	nd	nd
66	nd	nd	nd	nd	nd

67	nd	nd	nd	nd	nd
68	nd	nd	nd	nd	nd
69	nd	nd	nd	nd	nd

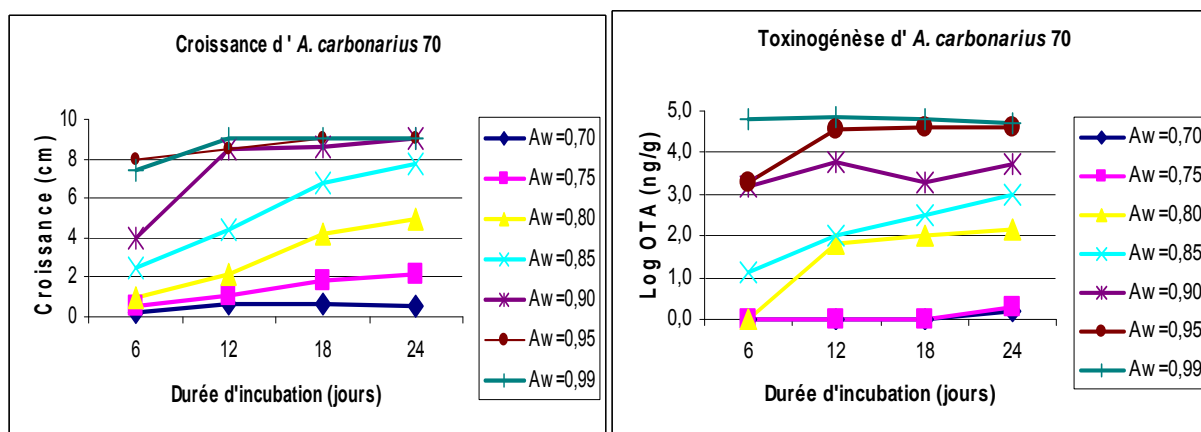
nd : non détectable, limite de détection $<0,03 \text{ ng.g}^{-1}$

Annexe 4 : Croissance et toxinogénèse des *Aspergillus carbonarius* 39 et 70 en fonction de l'activité de l'eau du milieu et de la durée d'incubation

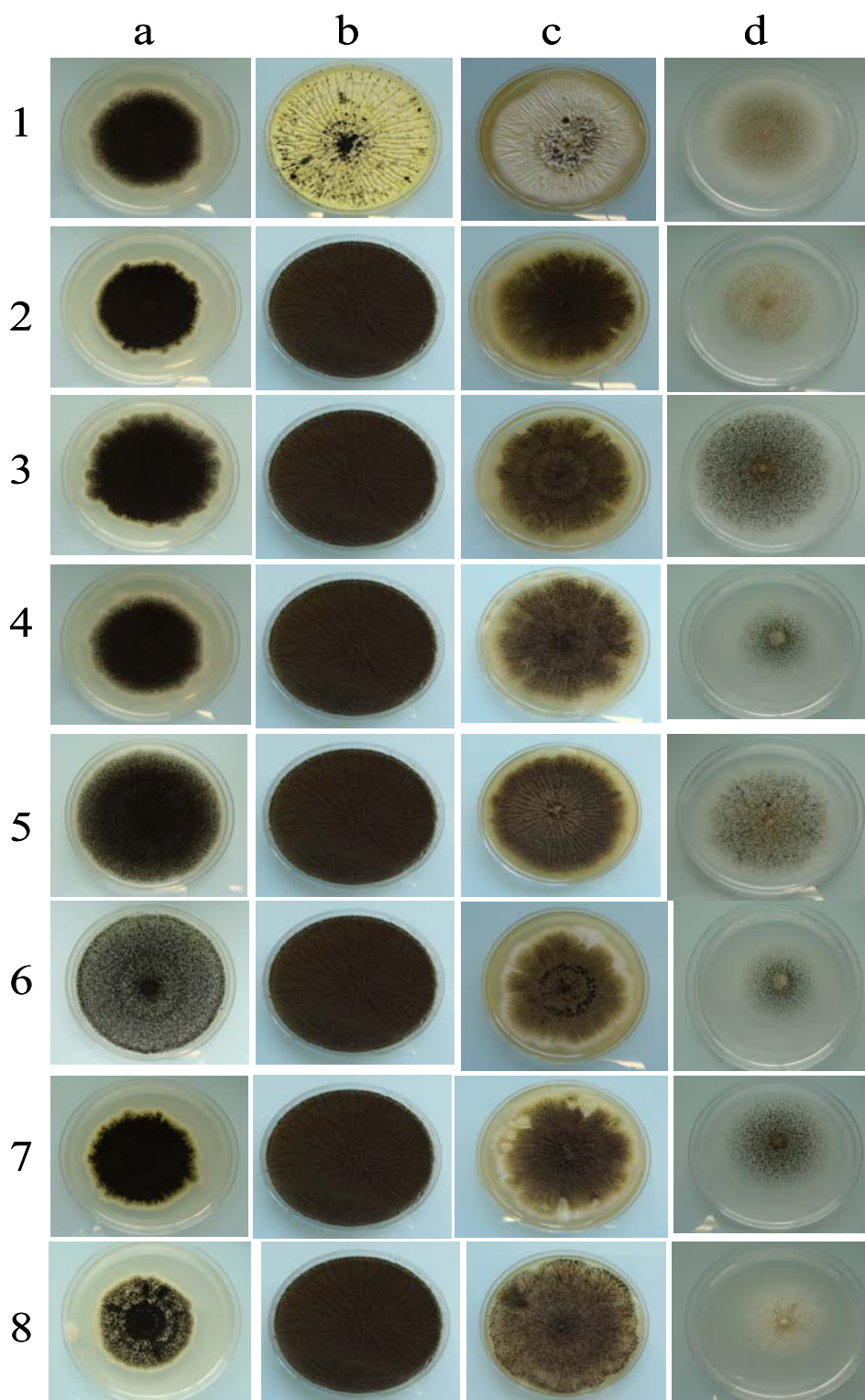
- *A. carbonarius* 39



- *A. carbonarius* 70

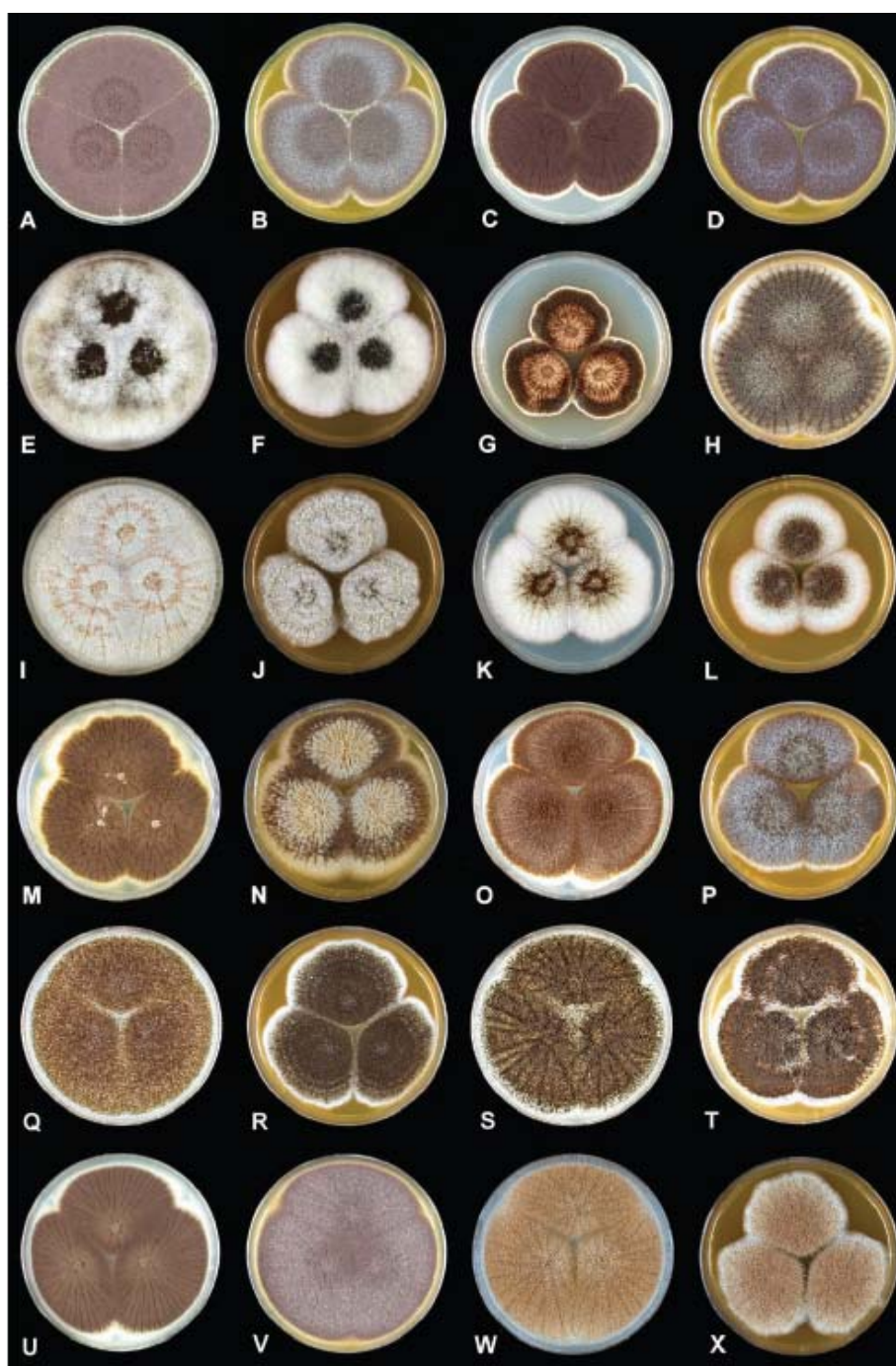


*Annexe 5 : Morphologie des *Aspergillus niger* agg isolés en culture sur plusieurs milieux de culture gélosé*



Morphologie des souches d'*A. niger* agg sur les milieux PDA, CYA, MEA et Zcapeck agar. *A. niger* agg groupe I (1, a-d), *A. niger* agg groupe II (2, a-d), *A. niger* agg groupe III (3, a-d), *A. niger* agg groupe IV (4, a-d), *A. niger* agg groupe V (5, a-d), *A. niger* VI (6, a-d), *A. niger* agg VII (7, a-d), *A. niger* agg VIII (8, a-d).

*Annexe 5' : Morphologie des *Aspergillus niger* agg en culture sur plusieurs milieux de culture gélosé selon Samson et al. (2007)*



Morphologie des différentes espèces d'*Aspergillus* section *Nigri* en culture sur les milieux de culture CYA et MEA. (A–B) *A. aculeatinus*, (C–D) *A. aculeatus*, (E–F) *A. brasiliensis*, (G–H) *A. carbonarius*, (I–J) *A. costaricensis*, (K–L) *A. ellipticus*, (M–N) *A. foetidus*, (O–P) *A. japonicus*, (Q–R) *A. heteromorphus*, (S–T) *A. homomorphus*, (U–V) *A. ibericus*, (W–X) *A. lacticoffeatus*.

Annexe 6 : Comparaison des séquences des fragments partiels ITS1/ITS2 de quelques souches d'*A. niger* agg isolées.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

P20_TUB_E03_023.ab1      -CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCCTTTGGGCCCAACC
P22_TUB_C04_028.ab1      NCTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCCTTTGGGCCCAACC
P18_TUB_D03_025.ab1      -CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCCTTTGGGCCCAACC
P17_TUB_C03_027.ab1      -CTTCCGTAGNNGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCCTTTGGGCCCAACC
P13_TUB_B03_029.ab1      NCTTCCGTAGNNAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCCTTTGGGCCCAACC
                          *****

P20_TUB_E03_023.ab1      TCCCATCCGTGTCTATTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTGCGCCGCCGG
P22_TUB_C04_028.ab1      TCCCATCCGTGTCTATTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTGCGCCGCCGG
P18_TUB_D03_025.ab1      TCCCATCCGTGTCTATTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTGCGCCGCCGG
P17_TUB_C03_027.ab1      TCCCATCCGTGTCTATTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTGCGCCGCCGG
P13_TUB_B03_029.ab1      TCCCATCCGTGTCTATTATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTGCGCCGCCGG
                          *****

P20_TUB_E03_023.ab1      GGGGGCGCCTCTGCCCCCGGGCCCGTGCCTGCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTG
P22_TUB_C04_028.ab1      GGGGGCGCCTCTGCCCCCGGGCCCGTGCCTGCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTG
P18_TUB_D03_025.ab1      GGGGGCGCCTCTGCCCCCGGGCCCGTGCCTGCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTG
P17_TUB_C03_027.ab1      GGGGGCGCCTCTGCCCCCGGGCCCGTGCCTGCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTG
P13_TUB_B03_029.ab1      GGGGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCGTGCCTGCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTG
                          *****

P20_TUB_E03_023.ab1      AAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCT
P22_TUB_C04_028.ab1      AAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCT
P18_TUB_D03_025.ab1      AAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCT
P17_TUB_C03_027.ab1      AAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCT
P13_TUB_B03_029.ab1      AAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCT
                          *****

P20_TUB_E03_023.ab1      TGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATT
P22_TUB_C04_028.ab1      TGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATT
P18_TUB_D03_025.ab1      TGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATT
P17_TUB_C03_027.ab1      TGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATT
P13_TUB_B03_029.ab1      TGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATT
                          *****

P20_TUB_E03_023.ab1      CAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCC
P22_TUB_C04_028.ab1      CAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCC
P18_TUB_D03_025.ab1      CAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCC
P17_TUB_C03_027.ab1      CAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCC
P13_TUB_B03_029.ab1      CAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCC
                          *****

P20_TUB_E03_023.ab1      TGTCCGAGCGTCATGCTNNNNNNNNNNNNNNNN--
P22_TUB_C04_028.ab1      TGTCCGAGCGTCAT-GCTGNNTNNNNNNNNNNNN--
P18_TUB_D03_025.ab1      TGTCCGAGCGTCAT-GCTGCCNNNNNNNNNNNNNN
P17_TUB_C03_027.ab1      TGTCCGAGCGTCAT-GCTGCCNNNNNGNNNNNNNN--
P13_TUB_B03_029.ab1      TGTCCGAGCGTCAT-GCTGCCNNNNNNNNNNNN--
                          *****

```

Annexe 7: Exemple de comparaison des séquences partielles ITS1/ITS2 de *A. niger* agg 20 (p20) avec celles disponibles dans la banque des données NCBI

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
EU330183.1	<i>Aspergillus niger</i> internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	695	695	98%	0.0	100%	
AM745113.1	<i>Aspergillus niger</i> ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, strain MACN2	695	695	98%	0.0	100%	
NW_001594105.1	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88 contig An03c0110, complete genome >emb AM270052.1 <i>Aspergillus niger</i> contig An03c0110, complete genome	695	2086	98%	0.0	100%	
AM087614.1	<i>Aspergillus awamori</i> 5.8S rRNA gene, ITS1 and ITS2, type strain ATCC 16877T	695	695	98%	0.0	100%	
AY373852.1	<i>Aspergillus niger</i> strain ATCC 16888 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	693	693	98%	0.0	100%	
AY373850.1	<i>Aspergillus foetidus</i> strain SRRC 321 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	693	693	98%	0.0	100%	
AY373840.1	<i>Aspergillus awamori</i> strain SRRC 332 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	693	693	98%	0.0	100%	
EF624000.1	<i>Aspergillus</i> sp. CMM-2007 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	686	686	99%	0.0	99%	
AB369898.1	<i>Aspergillus niger</i> genes for small subunit rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and large subunit rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 54309	684	684	98%	0.0	99%	
EF151436.1	<i>Aspergillus awamori</i> isolate F11 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	684	684	98%	0.0	99%	
AM745112.1	<i>Aspergillus tubingensis</i> ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, strain A1KA	684	684	98%	0.0	99%	
DQ235784.1	<i>Aspergillus awamori</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	684	684	98%	0.0	99%	
DQ206869.1	<i>Aspergillus niger</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	684	684	98%	0.0	99%	
AF021264.1	<i>Gliocladium cibotii</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	684	684	98%	0.0	99%	
AJ280008.1	<i>Aspergillus tubingensis</i> partial 18S rRNA gene, 5.8S rRNA gene, partial 28S rRNA gene, internal transcribed spacer 1 (ITS1) and internal transcribed spacer 2 (ITS2), isolate CBS 643.92	684	684	98%	0.0	99%	
EU301660.1	<i>Aspergillus niger</i> isolate 30 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	682	682	98%	0.0	99%	
AJ223853.1	<i>Aspergillus tubingensis</i> (strain CBS 134.48) 5.8S rRNA gene	676	676	98%	0.0	99%	
EU314994.1	<i>Aspergillus awamori</i> isolate FKCB-043 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	675	675	99%	0.0	98%	

ASPERGILLUS NOIRS PRODUCTEURS D'OTA DANS LE CACAO :

Biodiversité et incidence des traitements post-récolte au Cameroun

Résumé : L'incidence des procédés post-récoltes sur la contamination du cacao par l'OTA a été étudiée. Le type de fermentation (caisse ou tas) n'a pas influencé de façon significative la microflore fongique totale, la toxinogénèse, ou la teneur en OTA des fèves. Par contre l'intégrité de la cabosse et le délai d'écabossage constituent des facteurs aggravants de cette contamination. Les souches ochratoxinogènes isolées appartiennent aux espèces *A. niger* agg (moins producteurs d'OTA avec une teneur maximale de 3,6 ng.g⁻¹) et *A. carbonarius* (dont la production maximale atteint 2772 ng.g⁻¹). Tous les isolats d'*A. carbonarius* sont producteurs d'OTA tandis que 8 % seulement des isolats d'*A. niger* agg le sont. La croissance et la toxinogénèse de ces souches sont dépendantes des conditions physico-chimiques et environnementales. L'activité de l'eau est un facteur essentiel (production optimale entre 0,95 et 0,99). Parmi certains constituants naturellement présents dans les fèves de cacao (caféine, théobromine et épicatechine), seule la caféine a montré un effet sur la croissance et la toxinogénèse. L'identification des *Aspergillus* du cacao grâce aux techniques de PCR avec des amorces spécifiques a permis de séparer *A. carbonarius* et le complexe d'*A. niger* agg. Par contre, les composants de ce complexe ne sont pas dissociables, ni par cette technique, ni par le séquençage des amplifiats des fragments partiels ITS₁/ITS₂. Les *Aspergillus* noirs isolés présentent une biodiversité importante. L'étude des profils génomiques obtenus par RAPD-PCR a montré que cette biodiversité n'est pas dépendante de l'année de la campagne cacaoyère, mais peut être influencée par le degré de transformation de la fève (*A. niger* agg et *A. carbonarius*), au quel s'ajoute le type de traitement post-récolte subi (*A. carbonarius*). L'état de la cabosse et plus généralement les bonnes pratiques agricoles constituent les meilleurs gages de l'innocuité.

Mots clés : cacao, traitement post-récolte, ochratoxine A, *A. carbonarius*, *A. niger* agg, biodiversité.

.....

BLACK ASPERGILLUS PRODUCING OTA IN COCOA:

Biodiversity and incidence of post-harvest processing in Cameroon

Abstract: The effect of post-harvest processes on cocoa contamination by OTA was studied.

The type of fermentation (box or heap) did not significantly influence total fungal microflora, toxigenesis, or bean OTA content. However, pod integrity and time to pod opening were aggravating factors for contamination. The ochratoxinogenic strains isolated belonged to the species *A. niger* agg (producing less OTA with a maximum content of 3.6 ng.g⁻¹) and *A. carbonarius* (for which the maximum reached 2772 ng.g⁻¹). All the *A. carbonarius* isolates were OTA producers, whereas only 8% of the *A. niger* agg isolates were. The growth and toxigenesis of these strains depended on physico-chemical and environmental conditions. Water activity was an essential factor (optimum production between 0.95 and 0.99). Among some chemical components naturally present in cocoa beans (caffeine, theobromine and epicatechin), only caffeine exhibited an effect on growth and toxigenesis. Identification of *Aspergillus* species on cocoa using PCR techniques with specific primers showed a possibility to separate *A. carbonarius* and the *A. niger* agg complex. However, the components of the complex were neither dissociable by this technique, nor by sequencing of the amplicates of the ITS₁/ITS₂ partial fragments. The black *Aspergillus* isolated displayed substantial biodiversity. A study of the genomic profiles obtained by RAPD-PCR revealed that this biodiversity is not dependent on the year of the cocoa season; however, it could be influenced by the degree of bean processing (*A. niger* agg and *A. carbonarius*), and by the type of post-harvest processing (*A. carbonarius*). Pod condition and, more generally, good agricultural practices were the best guarantee of safety.

Keywords: cocoa, post-harvest processing, ochratoxin A, *A. carbonarius*, *A. niger* agg, biodiversity.