



La lutte biologique contre l'ochratoxine A : utilisation des extraits de plantes médicinales ainsi que des souches d'actinobactéries et mise en évidence de leur mode d'action

Rachelle El Khoury

► To cite this version:

Rachelle El Khoury. La lutte biologique contre l'ochratoxine A : utilisation des extraits de plantes médicinales ainsi que des souches d'actinobactéries et mise en évidence de leur mode d'action. Génie chimique. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT; Université Saint-Joseph (Beyrouth). Ecole supérieure d'ingénieurs de Beyrouth, 2017. Français. NNT : 2017INPT0049 . tel-04222833

HAL Id: tel-04222833

<https://theses.hal.science/tel-04222833>

Submitted on 29 Sep 2023

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

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



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Génie des Procédés et de l'Environnement

Présentée et soutenue par :

Mme RACHELLE EL KHOURY

le vendredi 16 juin 2017

Titre :

La lutte biologique contre l'ochratoxine A: utilisation des extraits de plantes médicinales ainsi que des souches d'actinobactéries et mise en évidence de leur mode d'action

Ecole doctorale :

Mécanique, Energétique, Génie civil, Procédés (MEGeP)

Unité de recherche :

Laboratoire de Génie Chimique (L.G.C.)

Directeur(s) de Thèse :

MME FLORENCE MATHIEU

M. ANDRE EL KHOURY

Rapporteurs :

M. HASSAN RAMMAL, UNIVERSITE LIBANAISE BEYROUTH

Mme SABINE GALINDO-SCHORR, UNIVERSITE MONPELLIER 2

Membre(s) du jury :

M. ROGER LTEIF, UNIVERSITE ST JOSEPH DE BEYROUTH, Président

M. ALI ATAQUI, UNIVERSITE LIBANAISE BEYROUTH, Membre

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

M. EMMANUEL COTON, UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE, Membre

Mme FLORENCE MATHIEU, INP TOULOUSE, Membre

M. RICHARD MAROUN, UNIVERSITE ST JOSEPH DE BEYROUTH, Membre

Where life begins and love never ends...

To you, Mom, Dad, Anthony and Tarek

Remerciements

Une thèse de doctorat est loin d'être un travail solitaire. De nombreuses personnes se sont retrouvées ainsi de manière fortuite ou non, pour le pire ou le meilleur, entre moi et mon doctorat. Ce sont certaines de ces personnes que j'aimerais mettre en avant dans ces remerciements.

En premier lieu, j'ai beaucoup de reconnaissance et d'admiration à témoigner à ma directrice de thèse, Pr. Florence Mathieu qui est un modèle professionnel pour sa gestion calme de son temps pourtant si chargé de responsabilités importantes. Florence merci pour la confiance que vous m'avez accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour votre disponibilité et pour la liberté que vous m'avez laissée tout au long de cette étude.

Un grand merci à mon directeur de thèse, Dr. André El Khoury pour la confiance, la liberté et l'indépendance que vous m'avez accordées, qui, à mon avis, m'ont laissé spontanément faire ressortir le meilleur de moi-même dans mon travail et comme personne. Merci pour m'avoir appris à être une scientifique autonome tout au long de ce travail de recherche. Nonobstant, votre relecture finale méticuleuse du manuscrit. Merci pour votre soutien moral, académique et scientifique...

Je tiens à remercier Pr. Alí Atoui, mon codirecteur de thèse, qui a suivi ce travail dans tous ses détails avec une rigueur scientifique exceptionnelle, ce qui m'a donné le courage pour poursuivre la réalisation de ce projet de recherche. Je vous remercie pour toutes les heures que vous avez consacrées à m'apprendre les différentes manips de biologie moléculaire, y compris techniques et précision. Merci pour vos suggestions toujours avisées.

Je commence à peine à mesurer la chance que j'ai eu d'effectuer ma thèse durant le mandat de monsieur le doyen et le codirecteur de ma thèse, Pr. Richard Maroun. Outre la profondeur rare de sa pensée scientifique, j'ai découvert quelqu'un d'intègre et de sincère, qualités éminemment rares et précieuses.

Je tiens à remercier les membres du jury et les rapporteurs Pr. Sabine Galindo-Schorr et Pr. Hassan Rammal et aux examinateurs Pr. Emmanuel Coton et Pr. Roger Lteif qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail.

Cette opportunité qui m'a été accordée à travers le programme de cotutelle, m'a permis de lier de nouvelles relations, tant professionnelles qu'amicales. Elle m'a accordé la chance de collaborer avec deux équipes; une équipe Libanaise assez solide, et une équipe Française de calibre. Je remercie donc toutes les personnes formidables que j'ai rencontrées par le biais de l'ENSAT. Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans l'accueil chaleureux que m'ont témoigné Elodie, Carole, Kathy, Philippe... je vous remercie pour le climat sympathique dans lequel vous m'avez permis de travailler. Je remercie aussi tous les membres du Laboratoire de la Faculté des Sciences, en particulier Dr. Charbel Afif, le « Super Hero » de l'HPLC, ainsi que mes chers stagiaires Mme. Hiba Kawtharani et M. Anthony El Khoury pour la sympathie et l'aide qu'ils m'ont témoignées durant la dernière année de dur labeur.

Finalement je ne peux pas oublier les amis et les camarades qui ont fait de ce parcours une merveilleuse expérience...

..Lara El Féghali, ma chère Larlour. En 2007, on était que deux étrangères à la FS en face de l'amphi 202. Et là, en 2017, tu es devenue la seule chose qui manquait dans ma vie... Une sœur... Merci pour ta gentillesse, tes mots d'encouragements et ton sourire angélique.

..Racha Majed et Christelle Abi Nader, sans vous la salle des doctorants aurait été grise et triste. C'est grâce à votre esprit positif et votre humeur que j'ai pu franchir les obstacles et les difficultés que j'ai rencontrées durant ces trois ans.

..Samer Yammine, tes mots d'encouragements, tes conseils et ton support ont fait de moi la femme indépendante et ambitieuse dont je suis aujourd'hui. Merci pour les bons moments et les merveilleux voyages et aventures, je ne les oublieraïs jamais.

..Jacques Al Kai, ami, frère et my biggest fan. Merci pour ta gentillesse, tendresse et affection. Sans toi mes séjours en France auraient été « sans couleurs ».

..Rita Chamaa et Tala Assí, my partners in Drama... vous avez fait de Toulouse ma deuxième maison, ville et famille... Votre humour, et soutien moral (dont j'avais besoin presque tous les jours!) m'ont encouragé à continuer jusqu'à la fin... Merci pour les weekends, les « girls' night in », les « girls' night out » et les robes de mariées ?!

..Rhoda El Khoury et joanna Tannous, mes collègues et amies. Merci pour votre présence ainsi que votre soutien moral et scientifique. Je n'oublierai jamais les sessions de beauté dans notre salle doc.

..Nay el Khoury, Marina Daccache, Rim Dbeïssy et Nadine Bejjani, grâce à votre esprit révolutionnaire, on a transformé la salle doc en salle 602. Ces souvenirs resteront à jamais dans ma tête.

List de publications

El Khoury, R., A. Atoui., C. Verheecke, R. Maroun., A. El Khoury and F. Mathieu (2016). "Essential Oils Modulate Gene Expression and Ochratoxin A Production in *Aspergillus carbonarius*." **Toxins** (Basel) 8(8).

El Khoury Rachelle, Atoui Ali, Mathieu Florence, Kawtharani Hiba, Khoury Anthony, Maroun Richard and El Khoury Andre. "Antifungal and Antiochratoxigenic Activities of Essential Oils and Total Phenolic Extracts: A comparative study." **Antioxidants**.

Articles soumis :

Soumis dans la revue « *Toxins* » :

El Khoury Rachelle, Mathieu Florence, Atoui Ali, Kawtharany Hiba, Khoury Anthony, AfifCharbel, Maroun Richard and El Khoury Andre. "Ability of Soil Isolated Actinobacteria Strains to Prevent, Bind and Biodegrade Ochratoxin A, a Common food Contaminant."

Conférences Internationales

5th International Symposium on Mycotoxins and Toxigenic Moulds: Challenges and Perspectives. Modulation of ochratoxin A genes' expression in *Aspergillus carbonarius* by the use of some essential oils, De Saeger, S.; Audenaert, K.; Croubels, S. Report from 5th International Symposium on Mycotoxins and Toxigenic Moulds: challenges and Perspectives (MYTOX) Held in Ghent, Belgium, May 2016. **Toxins** 2016, 8(5), 146; doi: 10.3390/toxins8050146.

The International Science Conference LAAS22 - Conférence Scientifique Internationale LAAS22: Composés phénoliques et huiles essentielles : inhibiteurs de l'ochratoxine A produite par *Aspergillus carbonarius*, Liban, Beirut, Avril 2016.

18th ISANH Middle East World Congress, Antoixydants on the 3rd and 4th of May 2017. Beirut, Lebanon

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Les principales mycotoxines ainsi que leurs effets possibles sur la santé de l'homme et leur occurrence dans les aliments et les denrées alimentaires (CAST 2003; AFSSA 2009) | 27 |
| Tableau 2 : Les niveaux de mycotoxines autorisés par l'Union Européenne (UE) dans les aliments et les denrées alimentaires qu'elles contaminent (recommandations N° 1425/2003 et N° 1881/2006) | 29 |
| Tableau 3 : Différentes espèces des champignons producteurs d'OTA | 34 |
| Tableau 4 : Conditions optimales pour la croissance d' <i>A. carbonarius</i> et la production de l'OTA sur milieu de raisin semi-synthétique (<i>Passamani et al. 2014</i>) | 37 |
| Tableau 5 : Caractéristiques des PKS dans le règne fongique, et chez <i>A. carbonarius</i> | 44 |
| Tableau 6 : Caractéristiques des NRPS dans le règne fongique, et chez <i>A. carbonarius</i> | 45 |
| Tableau 7 : Caractéristiques de l'halogénase/chloroperoxydase chez <i>A. carbonarius</i> . | 46 |
| Tableau 8: Gènes de biosynthèse de l'OTA identifiés chez les producteurs majeurs de l'OTA (N.I. : non identifié) | 47 |
| Tableau 9 : Effet de plusieurs sources de carbone sur la croissance d' <i>A. carbonarius</i> et la production de l'OTA | 53 |
| Tableau 10 : Effet des huiles essentielles sur la croissance des champignons ochratoxinogènes. CMF : Concentration Minimale Fongicide | 66 |
| Tableau 11 : Concentrations minimales fongicides (CMF) de différents composés phénoliques sur des cultures d' <i>A.carbonarius</i> | 69 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Les différentes voies métaboliques des mycotoxines..... | 23 |
| Figure 2 : Répartition géographique des mycotoxines dans le monde, en se basant sur les pourcentages des échantillons contaminés. Schéma réalisé par Kovalsky (2014). | 31 |
| Figure 3 : Structure chimique de l'OTA. Schéma adapté et modifié de El Khoury and Atoui (2010)..... | 32 |

| | |
|--|----|
| Figure 4 : (I) Culture sur milieu CYA de (A) <i>A. carbonarius</i> , (B) <i>A. niger</i> . (II) Conidies de (A) <i>A. carbonarius</i> et (B) <i>A. niger</i> | 36 |
| Figure 5 : Schéma représentant la structure microscopique d' <i>A. carbonarius</i> | 36 |
| Figure 6 : Schéma de la première voie hypothétique de la biosynthèse de l'OTA. | 42 |
| Figure 7 : Schéma montrant la voie de biosynthèse de l'OTA proposée en 2016 chez <i>A. carbonarius</i> . Schéma adapté et modifié de Ferrara <i>et al.</i> (2016). | 43 |
| Figure 8 : Structure chimique des métabolites de l'OTA | 44 |
| Figure 9 : Représentation schématique des différents clusters hypothétiques de la voie de biosynthèse de l'OTA chez <i>A. carbonarius</i> (Ferrara <i>et al.</i> , 2016), <i>A. steynii</i> (Gil-Serna <i>et al.</i> , 2015), <i>A. niger</i> et <i>P. nordicum</i> (Karolewicz and Geisen, 2005). | 47 |
| Figure 10 : Interaction entre les complexes de la famille « velvet » et la protéine LaeA chez <i>A. nidulans</i> . (KapA : protéine de transport)..... | 51 |
| Figure 11 : Pratiques et conditions influençant les teneurs de l'OTA dans les fruits et les grains. | 60 |

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|----|
| Introduction bibliographique..... | 18 |
| A. Mycotoxines, définition et généralité..... | 22 |
| A.I. Champignons producteurs | 24 |
| A.II. Occurrence et toxicité des mycotoxines | 26 |
| A.III. Réglementation..... | 28 |
| B. Ochratoxine A..... | 31 |
| B.I. Historique..... | 31 |
| B.II. Structure chimique et propriétés physico-chimiques de l'OTA | 32 |
| B.III. Occurrence dans les aliments, exposition de l'homme et principaux producteurs..... | 33 |
| B.IV. <i>Aspergillus carbonarius</i> : le contaminant majeur des raisins | 35 |
| B.V. Toxicité de l'OTA | 38 |
| B.VI. Voie de biosynthèse | 41 |
| B. VII. Moyens de lutte contre l'OTA | 57 |

| | |
|---|-----|
| Chapitre 1 | 76 |
| Etude comparative des effets antifongiques et antiochratoxinogènes des composés phénoliques et huiles essentielles..... | 76 |
| I. Introduction..... | 77 |
| II. Article soumis dans la revue <i>Journal of Applied Microbiology</i> | 78 |
| III. Conclusion..... | 90 |
| Chapitre 2 | 92 |
| Huiles essentielles : agents antiochratoxinogènes, antifongiques et réprimeurs des gènes de biosynthèse chez <i>Aspergillus carbonarius</i> | 92 |
| I. Introduction..... | 93 |
| II. Article publié : Essential Oils Modulate Gene Expression and Ochratoxin A Production in <i>Aspergillus carbonarius</i> , <i>Toxins</i> (8), 8-242. | 94 |
| III. Conclusion..... | 112 |
| Chapitre 3 | 114 |
| Détoxicification de l'OTA par des actinobactéries isolées du sol : adhésion, biodégradation et répression des gènes de biosynthèse de l'OTA chez <i>Aspergillus</i> | 114 |
| I. Introduction..... | 115 |
| II. Article soumis dans la revue <i>Toxins</i> | 116 |
| III. Conclusion..... | 126 |
| Discussion générale et perspectives..... | 162 |

Liste des abréviations

OTA Ochratoxine A

NEB Néphrite Endémique du Balkans

IARC International Agency of Research on Cancer

A. *Aspergillus*

NRPS Non Ribosomal Peptide Synthase

PKS Polykétide Synthase

P. *Penicillium*

AFSSA Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AF Aflatoxine

CYA Czapec-Yeast Agar

LD Dose Léthale

HOG High osmolarity Glycerol

HPLC High Performance Liquid Chromatography

H.E Huiles Essentielles

CMF Concentration Minimale Fongicide

S. *Saccharomyces*

PBS Phosphate Buffer Solution

PDA Potato Dextrose Agar

ISP2 International *Streptomyces* Project-2

WHO World Health Organisation

SOD Superoxyde Dismutase

RPM Round Per Minute

RT Reverse Transcriptase

ROS Espèce Réactive de l'oxygène

qPCR Quantitative Poly-Chain Reaction

PAT Patuline

LAB Bactéries lactiques

FUM Fumonisine

FDA Food and Drug Administration

FAO Food and Agriculture Organisation

EU European Union

DMATS Dimethylallyl Tryptophane Synthase

Aw Activité de l'eau

Résumé

L'ochratoxine A (OTA) est une mycotoxine issue du métabolisme secondaire des champignons filamenteux appartenant aux genres *Penicillium* et *Aspergillus*. Cependant, *Aspergillus carbonarius* est le majeur producteur de l'OTA sur les raisins. L'OTA a été retrouvée dans différents types de denrées alimentaires ainsi que leurs produits dérivés. Le profil toxicologique de l'OTA due aux effets néfastes qu'elle présente sur la santé humaine et animale (effets hépatotoxiques, immunotoxiques, génotoxiques, tératogènes et cancérogènes) a conféré à cette mycotoxine une attention majeure auprès des instances internationales afin de limiter son occurrence. Ce projet est dédié pour trouver un moyen de lutte biologique, pouvant réduire l'OTA produite par *A. carbonarius* d'une part, et détoxifier les matrices alimentaires non conformes aux normes d'une autre part. La première stratégie était d'employer des huiles essentielles (cardamome, céleri, cannelle, taramira, origan, feuille de laurier, cumin, fenugrec, mélisse, menthe, sauge, anis, camomille, fenouil, romarin, romarin et thym) ainsi que des composés phénoliques extraits de plantes médicinales (feuille de laurier, cumin, fenugrec, mélisse, menthe, sauge, anis, camomille, fenouil, romarin et thym) afin d'évaluer leur effet sur la production de l'OTA dans le milieu SGM. Cette approche a été complétée par une étude moléculaire dans le but d'évaluer l'expression des gènes de biosynthèse de l'OTA (*acpk*s, *acOTApk*s et *acOTAnrp*s) ainsi que les gènes de régulation (*veA* et *laeA*) chez *A. carbonarius*. Les résultats ont décelé que les huiles essentielles ont une activité fongicide plus élevée que celle des extraits phénoliques. Effectivement, les huiles essentielles du thym, de l'origan, du taramira, et de la cannelle ont bloqué complètement la croissance d'*A. carbonarius*. Cependant, les huiles essentielles du fenouil, de la cardamome, de l'anise, de la camomille, du céleri et du romarin ont réduit l'OTA sans autant affecter la croissance fongique. Le mode d'action de ces dernières a été mis en évidence en suivant l'expression des gènes *acpk*s, *acOTApk*s, *acOTAnrp*s, *veA* et *laeA*, impliqués dans la biosynthèse de l'OTA chez *A. carbonarius*. Le gène *acpk*s a été réprimé le plus (99.2%) quand *A. carbonarius* a été mis en culture avec 5 µL/mL du fenouil, entraînant ainsi une réduction de 88.9% de l'OTA.

La deuxième stratégie était de développer un moyen de lutte biologique pouvant détoxifier les matrices alimentaires contaminées. Cette méthodologie a été développée suite à l'utilisation de sept souches d'actinobactéries (AT10, AT8, SN7, MS1, ML5, G10 et PT1), en évaluant leur capacité à métaboliser l'OTA, adhérer cette toxine à leur paroi membranaire ainsi que leur effet sur l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'OTA chez *A. carbonarius* (*acpk*s, *acOTApk*s, *acOTAnrps*, *veA* et *laeA*). Les résultats ont montré que toutes les souches possèdent la capacité d'adhérer l'OTA à leur surface, notamment la souche SN7 qui a réduit 33% de l'OTA après 60 minutes d'incubation dans une solution PBS (Phosphate Buffer Solution) non nutritive. Les souches AT10 et SN7 ont métabolisé 51.94 et 52.68% de l'OTA ajoutée au milieu ISP2 (International *Streptomyces* Project-2) après 5 jours de culture à 28 °C. Cependant, les souches MS1, ML5 et G10 étaient les seules à avoir un effet sur l'expression des gènes de biosynthèse de l'OTA chez *A. carbonarius*. Effectivement les gènes *acpk*s, *acOTApk*s et *acOTAnrps* ont été réprimés respectivement de 37.1, 23.9 et 21% par MS1, de 39, 23 et 11.1% par ML5 et de 39, 18.3 et 11.1% par la souche G10. Ce projet a mis en valeur la capacité des extraits naturels (composés phénoliques et huiles essentielles) et des actinobactéries à prévenir d'une part la production de l'OTA et d'autre part réduire ses taux, sans pourtant affecter l'équilibre naturel ni engendrer l'apparition des débris toxiques dans les aliments traités.

Abstract

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin derived from the secondary metabolism of filamentous fungi belonging to the *Penicillium* and *Aspergillus* genera. However, *Aspergillus carbonarius* is the major producer of OTA on grapes. OTA has been detected in different types of foodstuffs as well as several products derived from these commodities. The toxicological profile of OTA and its adverse effects on human and animal health (hepatotoxic, immunotoxic, genotoxic, teratogenic and carcinogenic effects) has given this mycotoxin a major attention of international committees in order to limit its occurrence. The aim of this project was to develop biological

techniques that can reduce OTA produced by *A. carbonarius* and detoxify non-compliant food matrices. The first strategy was achieved by using essential oils (cardamom, celery, cinnamon, taramira, oregano, bay leaf, cumin, fenugreek, melissa, mint, sage, anise, chamomile, fennel, rosemary and thyme) and phenolic compounds extracted from medicinal plants (bay leaf, cumin, fenugreek, melissa, mint, sage, anise, chamomile, fennel, rosemary, and thyme) to evaluate their effect on OTA production in SGM medium. This approach was complemented by a molecular study to evaluate the expression of the OTA biosynthesis genes (*acpk*s, *acOTApk*s and *acOTAnrp*s) as well as the regulatory genes (*veA* and *laeA*) in *A. carbonarius*. The results revealed that essential oils had more significant fungicidal activity than phenolic extracts. Indeed, the essential oils of thyme, oregano, taramira, and cinnamon completely blocked the growth of *A. carbonarius*. However, essential oils of fennel, cardamom, anise, chamomile, celery and rosemary reduced OTA without affecting fungal growth. The mode of action of these essential oils has been demonstrated by evaluating the expression of *acpk*s, *acOTApk*s, *acOTAnrp*s, *veA* and *laeA* genes in *A. carbonarius*. The expression of *acpk*s was repressed the most (up to 99.2%) when *A. carbonarius* was cultured with 5 µL / mL of fennel essential oil, resulting in a 88.9% of reduction in the OTA produced by this fungus. The second strategy was developed in order to detoxify contaminated food matrices. This methodology was achieved by using seven strains of actinobacteria (AT10, AT8, SN7, MS1, ML5, G10 and PT1), and evaluating their ability to metabolize OTA, adhere this toxin to their membrane walls and their effect on the expression of the genes involved in the biosynthesis of OTA in *A. carbonarius* (*acpk*s, *acOTApk*s, *acOTAnrp*s, *veA* and *laeA*). The results showed that all strains were able to bind OTA to their surfaces, especially the SN7 strain which reduced 33% of OTA after incubation for 60 minutes in PBS (Phosphate Buffer Solution). The strains AT10 and SN7 metabolized 51.94 and 52.68% of the OTA added to the ISP2 medium (International *Streptomyces* Project-2) after 5 days of culture at 28° C. However, MS1, ML5 and G10 were the only strains to have an effect on the expression of the OTA biosynthesis genes in *A. carbonarius*. Indeed, *acpk*s, *acOTApk*s and *acOTAnrp*s genes

were repressed respectively by 37.1, 23.9 and 21% by MS1, 39, 23 and 11.1% by ML5 and 39, 18.3 and 11.1% by the strain G10. This project highlighted the power of natural extracts (phenolic compounds and essential oils) as well as strains of actinobacteria to prevent OTA production on one hand and to detoxify contaminated commodities on the other hand without altering the natural microbial balance.

Introduction bibliographique

La contamination des aliments par des molécules toxiques est devenue une des préoccupations majeures de nos jours surtout que le nombre de ces contaminants est en augmentation sans cesse dans la nature. Parmi ces contaminants, **les mycotoxines** font partie de toxiques qui retiennent l'attention des instances dans le monde entier en raison des pertes qu'elles engendrent au niveau économique et à cause de leur mauvais effet sur la santé de l'homme et de l'animal. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, près de 25% des denrées alimentaires sont éliminées chaque année suite à leur contamination par les mycotoxines, ce qui est équivalent à 1 milliard de tonnes d'aliments perdus, ce fait a incité la communauté scientifique à mieux comprendre l'origine de ces mycotoxines, leur toxicité et leur voie de biosynthèse, afin de pouvoir mieux lutter contre leur occurrence dans les produits destinés à la consommation des humains ou des animaux.

Les interactions entre les champignons filamenteux et les éléments de l'environnement extérieur tels que le type du nutriment, le pH, la température ainsi que les stress oxydatif et osmotique, favorisent ou non la production de ces mycotoxines sous forme de métabolites secondaires conférant ainsi à leurs producteurs fongiques des avantages compétitifs. Une fois ingérées, les mycotoxines peuvent causer de **diverses maladies** ou « mycotoxicoses » dont la gravité dépend de la nature de mycotoxines, la dose ainsi que la durée de l'exposition. Les mycotoxicoses sont donc des analogues aux pathologies causées par l'exposition aux pesticides ou aux résidus de métaux lourds.

Le terme mycotoxine a été premièrement utilisé en 1962 suite à une crise vétérinaire inhabituelle à Londres, Angleterre, pendant laquelle environ 100 000 dindons ont été trouvés morts. Cet évènement tragique connu sous le nom de « Turkey X-disease » a été dû suite à un repas d'arachide contaminé par des métabolites secondaires (aflatoxines) produites par le champignon *Aspergillus flavus*. Depuis cette période, la rubrique des mycotoxines a été étendue pour inclure beaucoup d'autres toxines fongiques connues auparavant (par exemple, les alcaloïdes

de l'ergot et la patuline) ainsi que de nouveaux métabolites secondaires révélés dans des études ciblées à la découverte de nouvelles mycotoxines, telle que l'ochratoxine A.

Depuis sa découverte en 1965, l'**ochratoxine A (OTA)** a fait partie des mycotoxines les plus étudiées à cause de ses effets néfastes sur la santé de l'homme. Parmi les toxines produites par le genre *Aspergillus*, seule l'OTA est potentiellement de la même importance que les aflatoxines. Ses principaux organes cibles sont les reins et le foie. Effectivement, c'est une molécule néphrotoxique pour toutes les espèces animales étudiées à ce jour et suspectée d'être à l'origine de la néphropathie endémique du Balkan (NEB), une tubulonéphrite interstitielle chronique. De plus, l'OTA est une toxine hépatique, tératogène puissante et cancérogène du groupe 2 B (classée par l'IARC en 1993). Cette toxine perturbe de même la physiologie cellulaire, inhibe la production de l'ATP mitochondriale et stimule la peroxydation lipidique cellulaire.

Son impact sur la santé publique a incité les organisations mondiales à mettre en place des mesures de sécurité afin de réduire sa consommation journalière en posant des **normes tolérables** propres à chaque denrée alimentaire. Ces restrictions ont provoqué la limitation des échanges commerciaux, surtout avec les pays souffrant des contaminations fréquentes et élevée en OTA, ce qui a augmenté les **pertes économiques** liées à l'occurrence de cette mycotoxine.

Pour toutes ces raisons, il semble essentiel de trouver des moyens de lutte contre la production de l'OTA ainsi que des moyens de détoxicification des produits agricoles contaminés. L'emploi des fongicides était parmi les solutions couramment utilisées pour la lutte contre les champignons ochratoxinogènes. Cependant, à cause de leurs effets toxiques démontrés leur utilisation est devenue de nos jours moins souhaitée.

La contamination prononcée de la filière vitivinicole en OTA dans le **bassin méditerranéen**, nous a encouragés à rechercher des moyens pouvant prévenir la

production de cette mycotoxine sur les raisins, en limitant la croissance du majeur champignon producteur « *A. carbonarius* », et/ou en réduisant la production de l'OTA par ce champignon.

A l'heure actuelle, de nouvelles stratégies sont recherchées à cet égard, dont la **lutte biologique** contre la croissance fongique et la réduction de la production de l'OTA. L'intérêt croissant d'utilisation des extraits naturels de plantes tels que les composés phénoliques et les huiles essentielles ont attiré l'attention, vu leur efficacité prouvée contre d'autres mycotoxines (telles que les aflatoxines) ainsi leur pouvoir antifongique contre les champignons filamenteux responsables de la production de ces mycotoxines.

Effectivement, dans la première partie de notre étude, nous nous sommes attachés à étudier les effets des **huiles essentielles** et de **composés phénoliques** extraits de mêmes plantes médicinales sur (1) la croissance d'*A. carbonarius*, (2) sa masse sèche et (3) sa capacité à produire l'OTA quand ce champignon est soumis à de différentes conditions de culture.

Afin de mieux comprendre l'effet de ces substances, il est indispensable de comprendre leur mécanisme d'action au niveau moléculaire, même si les gènes de biosynthèse et de régulation de l'OTA chez *A. carbonarius* sont jusqu'à présent partiellement identifiés.

Ainsi, La deuxième partie consiste à **élucider un mécanisme d'action** moléculaire propre à chaque huile essentielle testée dans cette étude. Notre intérêt s'est surtout porté sur les huiles qui ont été capables d'inhiber la production d'OTA sans avoir pour autant altérés le développement fongique. De ce fait, nous nous sommes focalisés sur l'étude de la **variation dans l'expression des gènes de biosynthèse** de l'OTA chez *A. carbonarius* mise en culture supplémentées des différentes huiles essentielles afin de pouvoir corréler ces variations aux niveaux de production de l'OTA.

Ces deux approches avaient pour but de prévenir la production de l'OTA. Cependant, la troisième partie de ce projet, a été dédiée pour la **détoxification** des denrées alimentaires, en employant des souches d'**actinomycètes** isolées du sol. Dans cette partie, nous avons étudié l'effet de ces bactéries sur (1) la **dégradation enzymatique** de l'OTA, (2) l'**adhésion** de cette toxine sur la paroi des actinomycètes et (3) la **modulation de l'expression des gènes** de biosynthèse de l'OTA chez *A. carbonarius* mis en culture avec ces bactéries.

A. Mycotoxines, définition et généralité

Les mycotoxines sont des contaminants naturels, définies comme étant des métabolites secondaires toxiques, produits par plusieurs espèces de champignons filamentueux, surtout par ceux appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* et *Claviceps* (Marin *et al.*, 2013). Ces métabolites sont universellement présents dans les aliments et les denrées alimentaires et retiennent aujourd'hui l'attention des milliers de chercheurs dans le monde entier, afin de mener des études sur leur origine, toxicité, voie de biosynthèse, et surtout sur les stratégies de contrôle de leur biosynthèse.

Le terme « mycotoxine » a pour origine la combinaison des termes « *mycos* » qui signifie champignon en grecque et « *toxicum* » qui signifie poison en latin (Jouany *et al.*, 2009, Rai *et al.*, 2012). Longtemps confinées aux pathologies provoquées par l'ergot du seigle, les mycotoxines ont été découvertes dans les années 1960 après l'infection de 100 000 dindes en Angleterre et leur mort due à une nécrose hépatique sévère (Bennett and Klich, 2003). Cette tragédie a été attribuée à la présence de concentrations trop élevées d'aflatoxines dans les arachides fournies à ces volailles (Medeiros *et al.*, 2012). La santé des êtres vivants et des animaux est gravement affectée non seulement par la présence des concentrations élevées de mycotoxines dans les aliments, mais aussi par la durée d'exposition, le type de mycotoxine et son mécanisme d'action, tout en prenant en compte le métabolisme de l'espèce concernée et de son mécanisme de défense (Hussein and Brasel, 2001). Du point de vue chimique, les mycotoxines sont des molécules de faible masse moléculaire (<1000 Daltons) (Bennett and Klich, 2003). La synthèse d'un type de mycotoxines peut être élaborée par diverses espèces fongiques, mais pas forcément par toutes les souches appartenant à la même espèce.

On réserve le terme « mycotoxines » aux métabolites secondaires fongiques qui présentent une toxicité pour les humains et d'autres vertébrés (Bennett and Klich, 2003). Jusqu'à maintenant, 300 mycotoxines ont été identifiées mais seulement une

vingtaine d'entre elles ont montré un profil toxicologique préoccupant pour l'homme et l'animal. Parmi cette vingtaine, six familles de mycotoxines sont fréquemment rencontrées chez les filières agro-alimentaires : l'aflatoxine, la patuline, l'ochratoxine, la fumonisine, les tricothécènes et la zéaralénone (Hendrickse *et al.*, 1982). Ces mycotoxines sont issues de différents voies métaboliques classées en 5 catégories, selon leur structure et leur précurseur : les polykétides (PKS), les terpènes cycliques (TC), les peptides cycliques non-ribosomiques (NRPS), les indoles alcaloïdes (DMATS) et les hybrides PKS/NRPS (Keller *et al.*, 2005) (Figure 1).

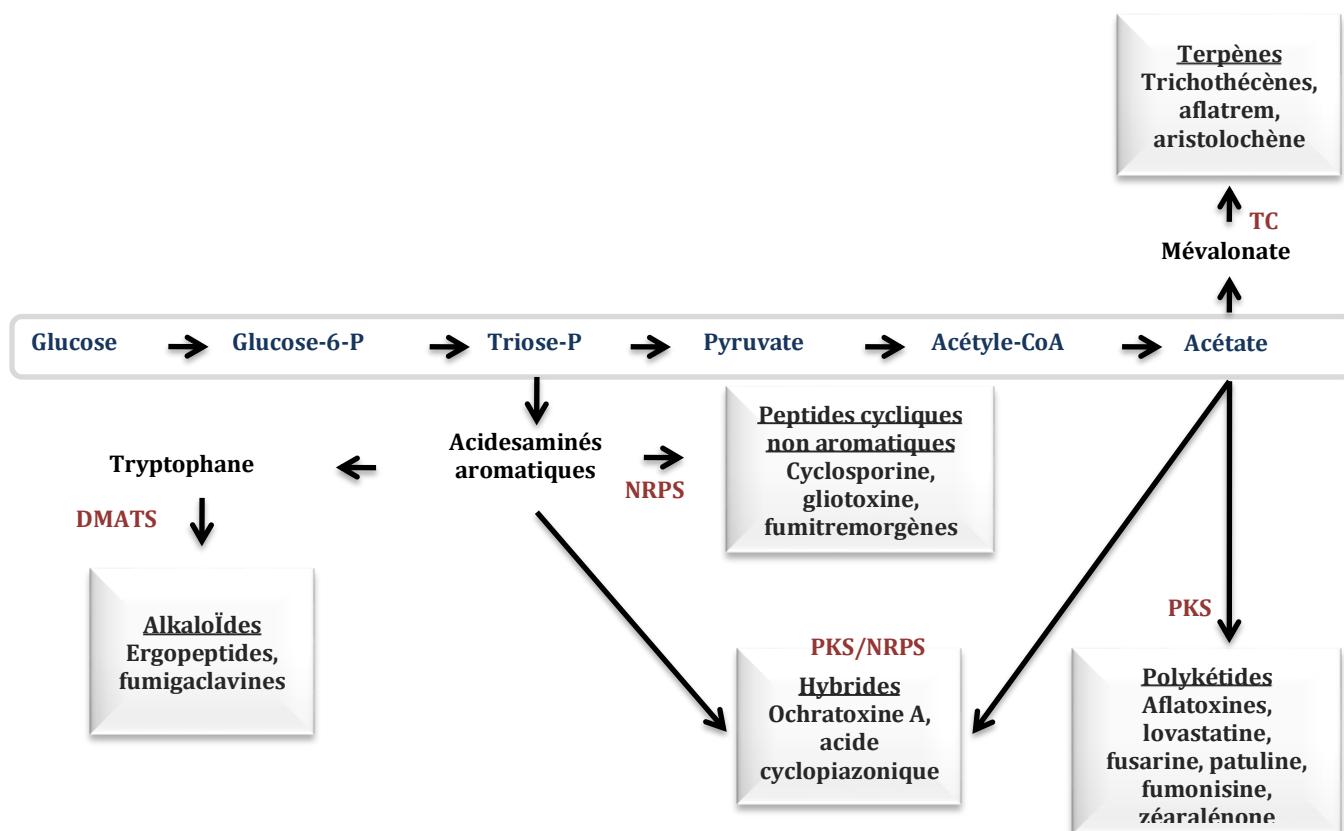


Figure 1 : Les différentes voies métaboliques des mycotoxines.

Abréviations : NRPS : non-ribosomal peptide synthétase ; PKS : polykétide synthase ; TC : terpènes cyclase ; DMAT : diméthyle allyle transférase.

La biosynthèse des métabolites secondaires fongiques débute par un précurseur, le triose-P ou l'acétate, selon la nature du produit final. Le triose-P aboutit à la formation des acides aminés aromatiques qui sont la base des peptides cycliques tels que la cyclosporine (métabolite secondaire utilisé dans le domaine de la médecine), la

gliotoxine et la fumitremorgène (deux mycotoxines produites par *A. fumigatus*) (Gardiner and Howlett, 2005, Boudra, 2002). Les acides aminés aromatiques sont de même des précurseurs du tryptophane, qui en présence de l'enzyme diméthyl allyle transférase sera transformé en des alcaloïdes (ergopeptides et fumigaclavines) généralement produits par des champignons du genre *Claviceps*.

L'acétate, le deuxième précurseur de la production des métabolites secondaires fongiques, conduit à la formation du mévalonate d'une part et des polykétides d'une autre part. En présence de l'enzyme terpène cyclase, la mévalonate donne des terpènes (trichothécènes, aflatrem et aristolochène). Les polykétides, formés par l'intermédiaire des PKS, sont la base de plusieurs mycotoxines, telles que l'aflatoxine, la fusarine, la zéaralénone, la patuline et la fumonisine (Yu *et al.*, 2004, Gaffoor and Trail, 2006, Puel *et al.*, 2010). Ces dernières sont produites par des champignons appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*.

Quant à la formation de l'OTA et de l'acide cyclopiazonique, ces toxines requièrent l'implication des polykétides et des acides aminés aromatiques. Ainsi, ce type de mycotoxine est nommé « hybride » et nécessite le travail des deux types d'enzymes PKS et NRPS, afin de former la molécule finale (Gallo *et al.*, 2014).

A.I. Champignons producteurs

Tout au long de la chaîne alimentaire, depuis le champ jusqu'à l'assiette du consommateur, et si les conditions environnementales sont favorables, les moisissures sont capables de synthétiser des mycotoxines. Ces moisissures, encore appelées champignons filamenteux toxinogènes, sont des organismes pluricellulaires appartenant au règne des « Mycètes ». Encore appelé règne « Fongique », ce dernier regroupe une vaste variété des champignons macroscopiques, de même que des champignons microscopiques, encore nommés moisissures, faisant l'intérêt de notre problématique. Ces dernières, notamment les moisissures toxiques, sont des organismes ubiquitaires proliférant dans l'environnement sur des substances

organiques et produisant des mycotoxines si les conditions d'humidité et la température sont favorables (Aydogdu and Gucer, 2009). Ces mycotoxines sont produites par plusieurs genres de champignons, citant *Cladosporium*, *Fusarium*, *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp. et *Penicillium* spp. (Legan, 2000).

Le genre *Penicillium* compte au moins 18 espèces mycotoxinogènes à savoir *P. crustosum*, *P. chrysogenum*, *P. hirsutum*, *P. expansum*, *P. roqueforti*, *P. viride*, *P. commune*, *P. aurantiogriseum*, *P. citrinum*, *P. verrucosum*, *P. cyclopium*, *P. canescens*, *P. madriti*, *P. palitans*, *P. thomii*, *P. baarnense*, *P. fenneliae* et *P. frequentans*. Ces espèces sont productrices de l'OTA, la citrinine, la patuline, l'acide cycloiazonique, l'acide penicillique, la roquefortine, la frequentine, la palitentine, l'acide mycophénolique, la gliotoxine, la citreoviridine et la rubratoxine B (Frisvad and Filtenborg, 1983, Frisvad and Thrane, 1996, Müller and Amend, 1997, Frisvad and Samson, 2004, Ismaiel and Papenbrock, 2014). Par ailleurs, ces espèces fongiques ainsi que les mycotoxines qu'elles produisent, envahissent les graines après leur récolte, causant des pertes économiques importantes dans différentes régions du monde.

Les espèces fongiques appartenant au genre *Aspergillus* sont aussi retrouvées dans les denrées alimentaires (Onions *et al.*, 1981, Richard, 2007). En effet, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. westerdijkiae* et *A. steynii* sont les producteurs majeurs de l'OTA qui fait partie des mycotoxines les plus menaçantes (Van der Merwe, 1965, Frisvad, 2004, Horie, 1995, Keller *et al.*, 2005, Bennett and Klich, 2003). Les deux espèces productrices d'aflatoxines les plus étudiées sont *A. flavus* et *A. parasiticus*, vu leurs dégâts sur la santé de l'homme, l'économie et leurs effets phytotoxiques affectant la qualité des plantes (Llewellyn *et al.*, 1984, McLean *et al.*, 1992). En ce qui concerne *A. niger*, espèce productrice d'OTA et fumonisine B2 (Nielsen *et al.*, 2009), elle aussi est considérée parmi les espèces d'*Aspergillus* les plus répandues, contaminant une grande variété de substrats et causant des dommages après la récolte (Ashiq, 2015, Pitt *et al.*, 2000).

Alternaria, Helminthosporium, Pyrenophora, Phoma et Zgosporium sont des moisissures saprobiques, elles sont pathogènes pour les plantes (phytopathogènes) et sont souvent associées aux maladies des feuilles, du bois et de certaines herbes. Les espèces appartenant à ces genres de champignons filamentueux, produisent des mycotoxines dangereuses comme les cytochalasines et l'acide tenuazonique (Ismaiel and Papenbrock, 2014).

Les membres du genre *Fusarium* produisent une gamme de composés phytotoxiques comme l'acide fusarique, les fumonisines (FUM B1 et B2), l'eniantin, la zéralénone et les tricothécènes (Barbosa *et al.*, 2013, Richard, 2007). Ces métabolites possèdent des activités biologiques variées et causent des dégâts morphologiques, physiologiques et métaboliques comprenant les nécroses, la chlorose, la réduction de la germination des graines et la diminution de la croissance des plantes (Nelson *et al.*, 1994, McLean, 1996).

A.II. Occurrence et toxicité des mycotoxines

Une fois trouvées dans les denrées alimentaires, les mycotoxines peuvent affecter la santé de l'homme ainsi que celle de l'animal. En effet, l'exposition aux mycotoxines se manifeste suite à la consommation des denrées alimentaires contaminées par des moisissures et/ou par des mycotoxines dépassant les doses autorisées (voie directe) ou suite à la consommation des produits dérivés des animaux contaminés, notamment la viande, le lait et les œufs, contenant des mycotoxines ingérées par ces animaux (voie indirecte).

Les syndromes causés suite à une inhalation ou une ingestion de mycotoxines par l'homme ou les animaux, sont appelés des « mycotoxicoses » (AFSSA, 2009). Une des mycotoxicoses les plus importantes est connue sous le nom de « l'ergotisme », définie comme étant le résultat d'empoisonnement, suite à l'ingestion à long terme des alcaloïdes issus de l'ergot du seigle (*Claviceps purpura*), un champignon qui infecte le seigle et d'autres céréales. L'ergotisme connu depuis les années 1750 sous le nom de

« Feu de Saint Antoine », devint épidémique en Europe centrale durant le moyen âge. Un autre exemple des mycotoxicoses est l'aleucie toxique alimentaire (ATA), une maladie historique causant la mort des milliers de Russes en 1940, des fièvres graves, des saignements de la peau, du nez et des gencives, ainsi que des nécroses et des répressions du système immunitaire avec une mortalité arrivant jusqu'à 80% (Nelson *et al.*, 1994). Plus tard, dans les années 1960, l'aflatoxine a été découverte suite à la mort de 100,000 dindes en Europe (Bennett and Klich, 2003). Le Tableau 1 résume les principales mycotoxines, leurs effets sur la santé, ainsi que les denrées et les commodités qu'elles contaminent.

Tableau 1: Les principales mycotoxines ainsi que leurs effets possibles sur la santé de l'homme et leur occurrence dans les aliments et les denrées alimentaires (CAST, 2003, AFSSA, 2009).

| Mycotoxines | Effets possibles sur la santé humaine | Denrées alimentaires |
|---|---|---|
| Aflatoxines (Lunn <i>et al.</i> , 1999, Leong <i>et al.</i> , 2010) | Maladies reliées au foie (hépatotoxique, hépato-cancérogène), effets cancérogènes et tératogénique, hémorragies (tractus intestinal, rénal), répressions immunitaires | Arachides, noisettes, céréales (maïs), lait, épices |
| Fumonisines (Chu and Li, 1994, Edrington <i>et al.</i> , 1995) | Œdèmes pulmonaires, néphro- et hépatotoxique, répressions immunitaires | Maïs |
| Tricothécènes (Arunachalam and Doohan, 2013, Pettersson, 1995) | Dérèglements digestifs (vomissement, diarrhée), perte de masse, hémorragies (estomac, cœur, intestin, poumons, vessie), lésions orales, dermatite, infertilité, dégénérescence de la moelle osseuse, répressions immunitaires | Céréales (blé, orge) |
| Zéaralénone (Maragos, 2010, Zinedine <i>et al.</i> , 2007) | Ostrogéniques, œdème de la vulve, prolapsus du vagin, élargissement de l'utérus, atrophie des testicules, atrophie des ovaires, infertilité, avortement | Maïs, blé |
| Ergots alcaloïdes (Bacon <i>et al.</i> , 1986, Alderman <i>et al.</i> , 1998) | Gangrènes, hallucinations, convulsions | Seigle |

| Mycotoxines | Effets possibles sur la santé humaine | Denrées alimentaires |
|--|---|--|
| Patuline (Cano-Sancho <i>et al.</i> , 2009, Mahfoud <i>et al.</i> , 2002) | Mutagéniques, génotoxiques, carcinogéniques | Fruits (pommes, poires) |
| Ochratoxines (Heussner and Bingle, 2015, Studer-Rohr <i>et al.</i> , 1995) | Néphrotoxiques, carcinogéniques, répressions immunitaires | Céréales (blé, maïs), vin, raisin, jus de raisin |

Certainement, les maladies aigües et les maladies chroniques causées par ces mycotoxines dépendent de la concentration de ces dernières et surtout du degré de toxicité propre à chaque mycotoxine. Chez les animaux, les maladies aiguës sont celles reliées à l'endommagement des reins et du foie, aux attaques du système nerveux central, ainsi qu'aux maladies de la peau et du système hormonal. Cependant les maladies chroniques se manifestent principalement par une génotoxicité (principalement causée par l'AFB1), une cytotoxicité, mutagénicité et une immunotoxicité, présentent de véritables soucis sur la santé de l'homme. Ces maladies chroniques sont dues à une consommation journalière et/ou régulière d'une quantité mineure de mycotoxine pendant une longue période causant avec le temps, l'apparition des troubles de façon insidieuse (Bryden, 2007). Afin de mieux évaluer les risques de chaque mycotoxine, l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classifié ces dernières en des Groupes, selon le degré de cancérogénicité de chacune (IARC, 1993). C'est ainsi que l'aflatoxine B1 (AFB1) a été classifiée comme étant un agent cancérigène pour l'homme : Groupe 1 (Boermans and Leung, 2007). L'OTA fait partie du Groupe 2B regroupant les agents « potentiellement cancérogènes pour l'homme ». La patuline et la zéralénone, toutes les deux classées en Groupe 3 : non cancérigènes pour l'homme.

A.III. Réglementation

Compte tenu des effets sur la santé humaine et animale provoquées suite à une intoxication par les mycotoxines, l'Union Européenne a édicté des textes réglementant

leur présence et leur teneur dans les denrées alimentaires. En 2003, l'Union Européenne a proclamé des régulations strictes (recommandations N° 1425/2003 et N° 1881/2006) en fixant les concentrations autorisées de chaque mycotoxine dans les aliments destinés à la consommation humaine. Le Tableau 2, regroupe les informations concernant les niveaux autorisés de mycotoxines dans les aliments selon l'UE.

Tableau 2 : Les niveaux de mycotoxines autorisés par l'Union Européenne (UE) dans les aliments et les denrées alimentaires qu'elles contaminent (recommandations N° 1425/2003 et N° 1881/2006)

| Mycotoxines | Variétés alimentaires | Concentration autorisée ($\mu\text{g/kg}$) |
|-------------|--|--|
| AFB1 | Cacahuètes et autres oléagineux ainsi que les produits finis destinés à la consommation humaine | 2.0 |
| | Cacahuètes et autres oléagineux destinés à des traitements physiques avant d'être consommés par l'homme | 8.0 |
| | Fruits secs, à l'exception des figues secs, ainsi que les produits finis destinés à la consommation humaine | 2.0 |
| OTA | Céréales qui n'ont subis aucun traitement | 5.0 |
| | Raisin sec | 10.0 |
| PAT | Vin (comprenant les vins mousseux, à l'exception des vins de liqueurs, et les vins dont le degré alcoolique dépasse les 15% vol), ainsi que les vins fruités | 2.0 |
| | Jus de raisin, jus de raisin concentré, nectar et moût de raisin, destinés à la consommation humaine | 2.0 |
| | Grains de café torréfiés ainsi que le café torréfié moulu | 5.0 |
| | Jus de fruits, jus de fruits concentré, et le nectar des fruits | 50.0 |
| | Jus de pomme et les produits de pommes, comprenant la compote ainsi que la purée de pomme, destinés à la consommation enfantine | 10.0 |
| | Les boissons spiritueuses, le cidre et d'autres produits fermentés à base de pomme ou contenant de jus de pomme | 50.0 |

| Mycotoxines | Variétés alimentaires | Concentration autorisée ($\mu\text{g/kg}$) |
|-------------|--|--|
| ZEA | Céréales qui n'ont subis aucun traitement | 100.0 |
| | Pain, pâtisseries, biscuits et céréales, à l'exception du maïs | 50.0 |
| | Produits issus de la transformation du maïs destinés à la consommation enfantine | 20.0 |
| FUM B1+B2 | Maïs n'ayant subis aucun traitement | 4000.0 |
| | Céréales du petit déjeuner à base de maïs | 800.0 |

Quant à la répartition géographique des mycotoxines, Devegowda *et al.* (1998) ont classifié les mycotoxines selon leur distribution mondiale. Leur étude a montré que les aflatoxines se trouvent majoritairement en Afrique et en Asie. Par contre, en Australie, ce sont les zéaralénone et les deoxynivalénols qui prédominent la région. Les fumonisines, le deoxynivalénol et les aflatoxines se trouvent en des taux élevés en Amérique du nord; quant à l'Amérique du sud, les deoxynivalénols ainsi que les fumonisines, l'ochratoxine A et la toxine T-2 étaient parmi les mycotoxines dominantes dans cette région. Cependant, dans les pays européens (Europe de l'Ouest et de l'Est), c'est l'ochratoxine A et la zéaralénone qui prédominent dans la région (voir **Figure 2**). Cette répartition dépend en grande partie des variétés cultivées (maïs, blé, riz, cacao, seigle, raisin, pomme) dans les différents pays du monde. Certaines moisissures ne se développent que sur des plantes spécifiques nécessitant un climat bien particulier. La répartition des familles de mycotoxines est donc liée au climat et par la suite à des zones géographiques délimitables. Toutefois, l'augmentation des échanges commerciaux peut aboutir à une invasion mondiale, indépendante des barrières géographiques et climatiques des familles de mycotoxines. Effectivement, les conditions dans lesquelles ces toxines sont produites dépendent fortement de deux facteurs principaux: la disponibilité de l'eau et la température qui affectent le cycle de vie des champignons mycotoxigènes. Il semble que le monde est confronté à des changements dans la répartition des mycotoxines suite aux changements climatiques. Ces dernières n'impliquent pas seulement une augmentation de la température, mais aussi une augmentation des niveaux de CO_2 , ainsi qu'une variation

importante dans les conditions météorologiques, y compris les changements dans les précipitations. Les variations de température et de la disponibilité de l'eau peuvent influencer l'efficacité des fongicides et des pesticides, appliqués avant la récolte. De même, le changement climatique peut modifier la répartition géographique ou le cycle de vie des insectes qui favorisent les infections fongiques des cultures (Kovalsky, 2014).

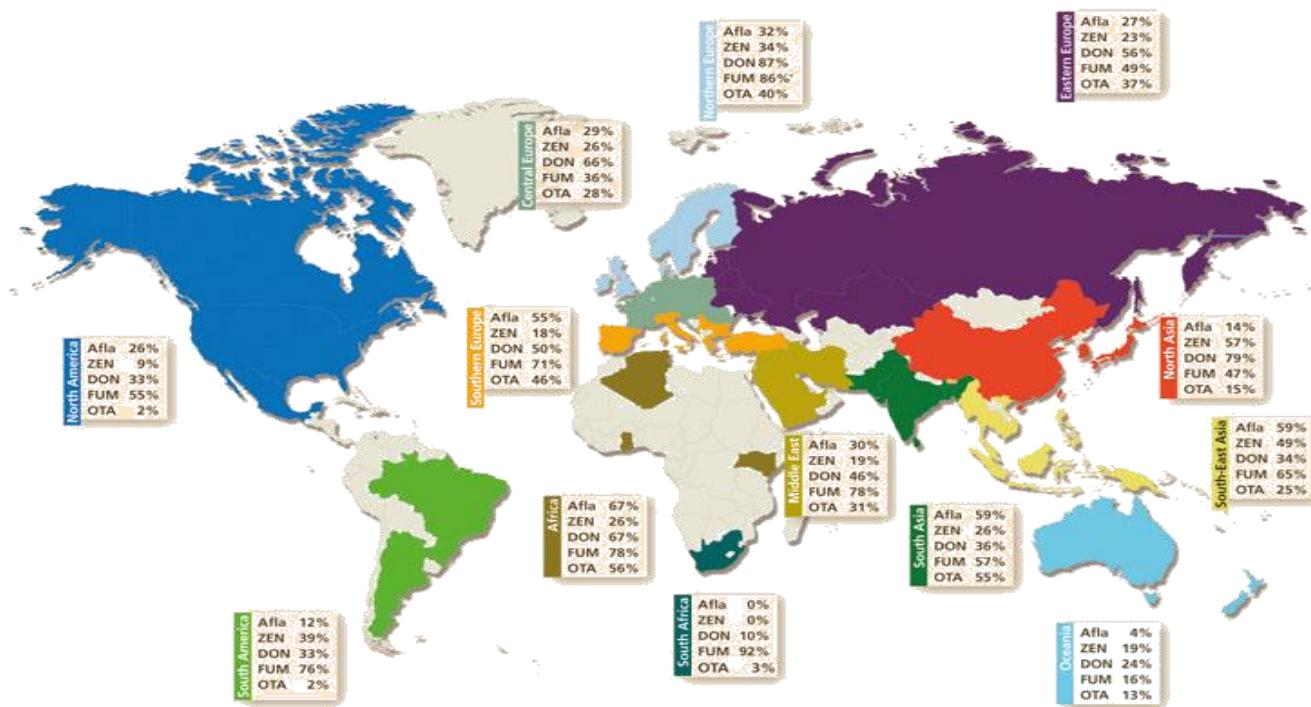


Figure 2 : Répartition géographique des mycotoxines dans le monde, en se basant sur les pourcentages des échantillons contaminés. Schéma réalisé par Kovalsky (2014)

B. Ochratoxine A

B.I. Historique

L'OTA a été originellement découverte en 1965 par une équipe de chercheurs Sud-Africains au cours d'une recherche systématique destinée à la découverte de nouvelles mycotoxines (Van der Merwe, 1965). Le premier champignon classé ochratoxinogène est *A. ochraceus*, mais plus tard, des études plus pointues ont montré que plusieurs espèces au sein des genres *Aspergillus* et *Penicillium* appartiennent aussi à cette catégorie (Horie, 1995, Abarca, 1994, Ciegler *et al.*, 1972).

B.II. Structure chimique et propriétés physico-chimiques de l'OTA

L'OTA est un pentakétide dérivé de la famille des hydrocouumarines, couplé à un acide aminé, le L- β -phénylalanine sur le carbone portant le groupe carboxyle. La nomenclature officielle de cette molécule selon l'UCPA est : L-phenylalanine-N-[{(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-2-benzopyran-7-yl) carbonyle]-(R)-isocoumarine (Ringot, 2006) et sa structure chimique est représentée dans la **Figure 3**.

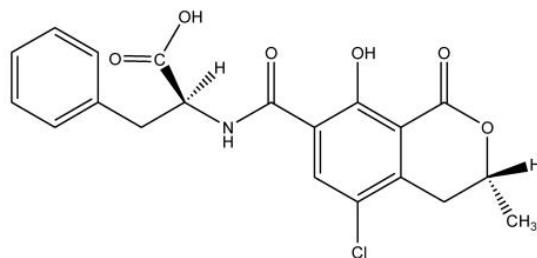


Figure 3 : Structure chimique de l'OTA. Schéma adapté et modifié de El Khoury and Atoui (2010).

C'est un acide organique faible avec un pKa égal à 7.1 (Kuiper-Goodman and Scott, 1989, Bredenkamp *et al.*, 1989) et une masse molaire de 403.8 g.mol⁻¹. Sous UV, cette molécule émet une fluorescence verte intense dans un milieu acide, et bleue dans un milieu alcalin (Budavari *et al.*, 1989). Dans des solutions à pH acide et neutre, l'OTA est soluble dans des solvants organiques polaires (alcool, cétones, chloroforme), très peu soluble dans l'eau mais complètement insoluble dans les hydrocarbures saturés. Néanmoins, dans les solutions à pH basique, cette molécule est soluble dans une solution de bicarbonate de sodium (solution aqueuse) et dans toutes les solutions basiques.

L'OTA est une molécule chimiquement stable et résistante aux températures bien élevées. Effectivement, cette toxine peut résister pendant 3 heures à une température stérilisante de 121 °C sous haute pression (Trivedi *et al.*, 1992, Boudra *et al.*, 1995). Ainsi, son élimination des denrées alimentaires reste jusqu'à présent une tâche difficile à exécuter (El Khoury and Atoui, 2010).

B.III. Occurrence dans les aliments, exposition de l'homme et principaux producteurs

L'OTA est une mycotoxine trouvée essentiellement dans les produits dérivés des plantes, comme à titre d'exemple les céréales (Park *et al.*, 2005), les haricots, les arachides, les épices (Overy *et al.*, 2003), les fruits secs (Drusch and Ragab, 2003), le café (Napolitano *et al.*, 2007), le lait et la bière (Skaug, 1999, Tangni *et al.*, 2002), et elle est surtout détectée dans les produits dérivés du raisin tels que le jus de raisin, le vin, et les raisins secs (Pietri *et al.*, 2001, Zimmerli and Dick, 1996, Rosa *et al.*, 2004). Le jus de raisin ainsi que les raisins secs ou déshydratés, utilisés dans les barres de céréales, biscuits et pain, suscitent de considérables inquiétudes aux niveaux national et international vue leur consommation élevée par les enfants, et donc représentent une source importante de consommation journalière d'OTA (Jordan, 2009). Afin de mieux contrôler son occurrence en Europe, la « Commission Européenne » a décidé en 1994 de créer un groupe de coopération scientifique, connu sous le nom de « SCOOP Task 3.2.2 » dans le but de rassembler toutes les informations sur l'apport de l'OTA absorbée via le régime alimentaire adopté dans les pays de l'Union Européenne (Majerus and Kapp, 2002). Vue la nécessité de fixer des teneurs maximales tolérables de certains contaminants d'origine naturelle (surtout l'OTA et les aflatoxines) dans les denrées alimentaires, cette commission a décidé (Décision 1999/143/EC) d'établir le rapport « Assurance sur l'apport d'ochratoxine A par le régime alimentaire dans l'Union Européenne » (Commission, 2004). Ce rapport a révélé la présence de l'OTA dans une grande variété des denrées alimentaires telle que les céréales, le café, la bière, le vin et la viande. Les concentrations trouvées sont variables allant de quelques ng/kg à plusieurs µg/kg (un échantillon de café vert contient 250 µg/kg d'OTA). Parmi 5180 échantillons de céréales, 55% sont contaminés avec des taux d'OTA arrivant à 33 µg/kg. Le cacao s'est avéré la denrée la plus fréquemment contaminée (81% des échantillons) mais avec des teneurs en OTA les plus faibles (moyenne de 0.277 µg/kg). Toutefois, la contamination des viandes par l'OTA accentue la possibilité d'une

contamination indirecte de l'homme, suite au stockage de l'OTA dans les muscles des animaux (volailles, porc) (Jorgensen, 1998). A cause de sa thermostabilité, l'OTA se maintient stable face aux procédés de transformation des aliments (cuisson, fermentation, torréfaction...), ce qui lui permet de se retrouver dans les produits dérivés de matières premières contaminées (Verger *et al.*, 1999).

L'OTA est une molécule produite non seulement par *A. carbonarius*, mais encore par une vaste variété d'espèces appartenant au genre *Aspergillus* section *Circumdati* et *Nigri* ainsi qu'au genre *Penicillium* (Tableau 3). En 2009, *A. westerdijkiae* et *A. steynii*, deux espèces appartenant à la section *Circumdati* ont été séparés d'*A. ochraceus* et semblent être des producteurs puissants d'OTA (Gil-Serna *et al.*, 2009). *P. nordicum* et *P. verrucosum* sont considérés comme des grands producteurs de cette toxine sur les céréales, la viande et une variété de fromages (Lund and Frisvad, 2003).

Tableau 3 : Différentes espèces des champignons producteurs d'OTA

| <i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i> | |
|--|--|
| <i>A. cretensis</i> | (Frisvad, 2004) |
| <i>A. flocculosus</i> | (Frisvad, 2004) |
| <i>A. melleus</i> | (Hesseltine, 1972) |
| <i>A. ochraceus</i> | (Van der Merwe, 1965), (Frisvad, 2004) |
| <i>A. ostianus</i> | (Hesseltine, 1972) |
| <i>A. persii</i> | (Ciegler, 1972) |
| <i>A. petrakii</i> | (Hesseltine, 1972) |
| <i>A. pseudoelegans</i> | (Frisvad, 2004) |
| <i>A. roseoglobulosus</i> | (Frisvad, 2004) |
| <i>A. sclerotiorum</i> | (Frisvad, 2004), (Hesseltine, 1972), (Varga, 1996) |
| <i>A. steynii</i> | (Frisvad, 2004) |
| <i>A. sulphureus</i> | (Frisvad, 2004), (Hesseltine, 1972), (Varga, 1996) |
| <i>A. westerdijkiae</i> | (Frisvad, 2004) |

| <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> | |
|---|-------------------------------|
| <i>A. alliaceus</i> | (Varga, 1996), (Bayman, 2002) |

| <i>Aspergillus section Nigri</i> | |
|----------------------------------|--|
| <i>A. carbonarius</i> | (Horie, 1995), (Samson, 2004) |
| <i>A. lacticoffeatus</i> | (Samson, 2004) |
| <i>A. niger</i> | (Samson, 2004), (Abarca, 1994) |
| <i>A. sclerotioriger</i> | (Samson, 2004) |
| <i>Penicillium</i> | |
| <i>P. nordicum</i> | (Larsen, 2001) |
| <i>P. verrucosum</i> | (Pitt, 1987), (Van Walbeek, 1969), (Ciegler, 1973) |

Les principaux champignons responsables de la production d'OTA dans les aliments et les denrées alimentaires sont *A. alliaceus*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. steynii*, *A. westerdijkiae*, *P. nordicum* and *P. verrucosum* (Frisvad, 2006).

B.IV. *Aspergillus carbonarius* : le contaminant majeur des raisins

1. Morphologie et niche écologique

Les champignons appartenant au groupe *Aspergillus section Nigri* (black *Aspergilli*) forment une alliance d'espèces de très grande importance dans les études de mycologie alimentaire, en biotechnologie et dans le domaine médical. *A. carbonarius* est un champignon filamenteux noir appartenant à cette section qui colonise les grains de céréales, de cacao et de café, les fruits (raisin) ainsi que les fruits secs (Joint, 2001, Cabañas *et al.*, 2002, Battilani *et al.*, 2006b). Son aspect macroscopique ne permet pas sa différenciation des autres black *Aspergilli*, dues aux ressemblances morphologiques macroscopiques entre les champignons noirs. Effectivement, la culture d'*A. carbonarius* et *A. niger* sur le milieu CYA engendre l'apparition de cultures noires, ne montrant aucune différence apparente entre les deux espèces (**Figure 4**) (Samson *et al.*, 2007).

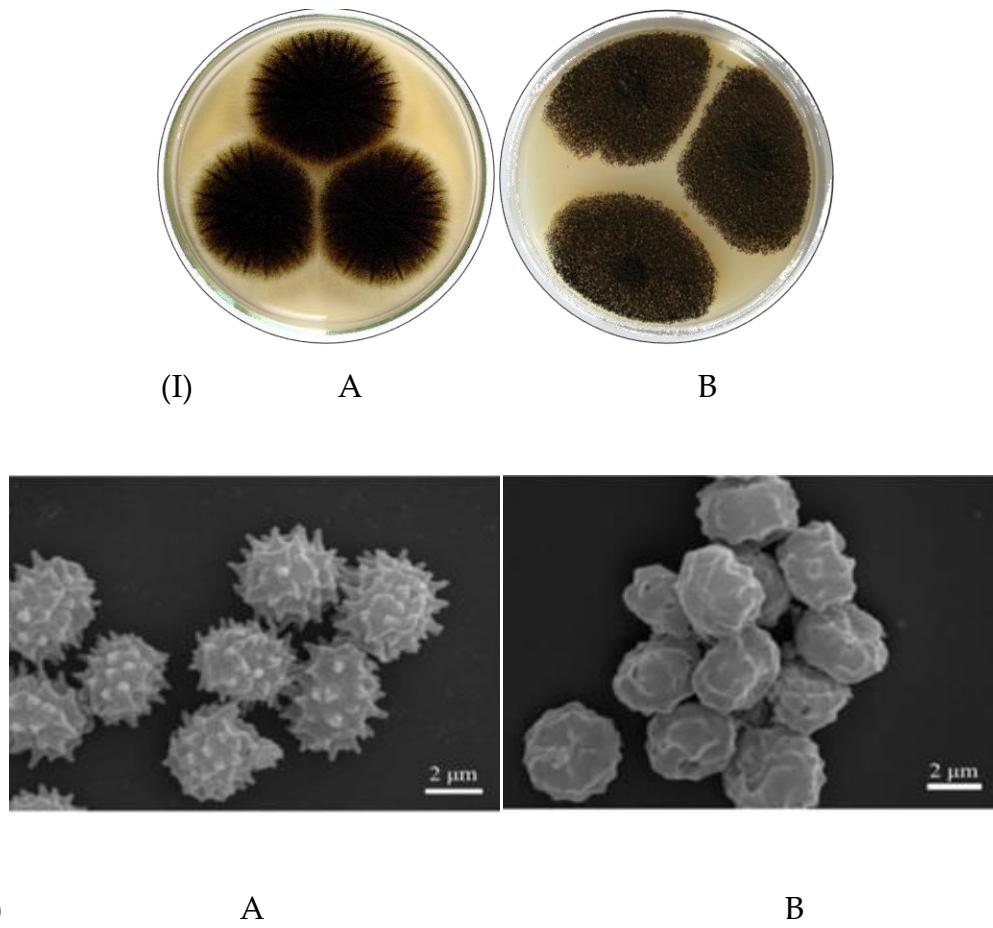


Figure 4 : (I) Culture sur milieu CYA de (A) *A. carbonarius*, (B) *A. niger*. (II) Conidies de (A) *A. carbonarius* et (B) *A. niger*

Néanmoins, au niveau microscopique, *A. carbonarius* a une structure assez particulière (**Figure 5**) : c'est un champignon bisérié ayant des conidiophores lisses de 2 à 3 μm de longueur, des vésicules sphériques de diamètre 60 à 90 μm , les métules sont de 12 à 18 μm et de très larges conidies de 6 à 8 μm de diamètre, noire et très rugueuses, voire pointues.

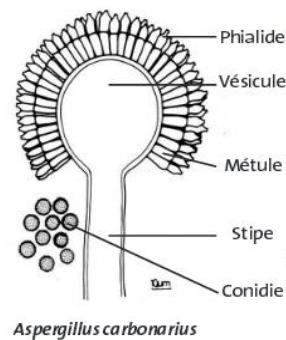


Figure 5 : Schéma représentant la structure microscopique d'*A. carbonarius*

En plus de ces caractéristiques morphologiques, *A. carbonarius* était le seul à pousser dans une gamme de température allant de 9 °C jusqu'à 36 °C (Samson *et al.*, 2007).

2. Facteurs affectant la croissance d'*A. carbonarius* et la synthèse de l'OTA

Le niveau de colonisation des champignons filamenteux est déterminé par les facteurs environnementaux régnants et la composition de la matrice alimentaire (Magan *et al.*, 2004). Ces moisissures peuvent produire des mycotoxines, si les conditions environnementales le permettent. Cependant la production de ces dernières est déclenchée durant la transition morphologique des champignons et dépend de plusieurs facteurs tels que la température, le pH du milieu ainsi que l'humidité et la teneur en eau (a_w) des substrats. Cependant, les conditions optimales de production de l'OTA sont généralement très différentes de celle de la croissance d'*A. carbonarius* (Tableau 4).

Tableau 4 : Conditions optimales pour la croissance d'*A. carbonarius* et la production de l'OTA sur milieu de raisin semi-synthétique (Passamani *et al.*, 2014)

| <i>A. carbonarius</i> | | | | | |
|------------------------------|-------|-----------|------------------------------|------|-------|
| Croissance fongique optimale | | | Production de l'OTA optimale | | |
| Température | pH | a_w | Température | pH | a_w |
| 20-33 °C | 5-6.5 | 0.95-0.98 | 15-25 °C | 5.35 | 0.99 |

La contamination des baies de raisin par *A. carbonarius* provoque leur pourriture et les rendent complètement sèches et rétrécies à un stade avancé. Cette incidence est étroitement liée aux conditions saisonnières dominantes durant la période de récolte du raisin. En effet, après la maturation des baies, elles sont riches en sucre, en matières nutritives et en eau, ce qui favorise la croissance fongique et la production des toxines (Battilani *et al.*, 2003, Leong *et al.*, 2006). Habituellement, les conidies fongiques sont présentes sur la pellicule à partir du début de véraison jusqu'à la récolte, arrivant à un pic durant la maturation. La gravité de la pourriture est influencée par la pluie et l'irrigation excessive, avant la maturation, provoquant ainsi la rupture des baies, le

fait qui augmente le risque de contamination par des champignons filamenteux (Leong *et al.*, 2006, Cozzi *et al.*, 2007).

Le projet « Wine-Ochra Risk » réalisé dans six pays Méditerranéens entre les années 2001 et 2005, montre que l'incidence de contamination du raisin par des champignons *Aspergillus* appartenant à la section *Nigri* est significativement corrélée avec la latitude et la longitude (Battilani *et al.*, 2006a). Suivant l'approche géostatistique décrite par Battilani *et al.* (2006a), l'occurrence d'*A. carbonarius* est plus importante en s'approchant vers le sud de l'Europe. La combinaison des paramètres « température » et « pluviosité » durant la période « fin Aout-début Septembre » dans plusieurs pays Méditerranéens, a permis la mise en œuvre des cartes « Thermo-humidité » pouvant prédire l'occurrence de l'OTA dans les vignobles. Les conditions météorologiques ainsi que la proximité de la mer jouent également un rôle majeur dans la détermination de l'occurrence de l'OTA dans les raisins (Cozzi *et al.*, 2007).

B.V. Toxicité de l'OTA

Le profil toxicologique de l'OTA a été largement évalué dans de nombreuses études au cours des années (Haughton *et al.*, 2012, O'Brien and Dietrich, 2005, El Khoury and Atoui, 2010, Mally, 2012, Vettorazzi *et al.*, 2014). L'OTA est la mycotoxine la plus dangereuse appartenant à la famille des ochratoxines. D'ailleurs, cette toxine a gagné sa place parmi les métabolites secondaires toxiques, en lien avec ses propriétés carcénogéniques, néphrotoxiques, tératogéniques, immunotoxiques et neurotoxiques (Pfohl-Leszkowicz and Manderville, 2007).

Durant la dernière décennie, les études menées sur le pouvoir **carcinogénique** de l'OTA ont attribué cet effet au mécanisme génotoxique indirect de cette molécule (mécanisme épigénique), relié au stress oxydatif, à la prolifération cellulaire compensatoire et à l'interruption des signaux de division cellulaire (Mally and Dekant, 2009, Vettorazzi *et al.*, 2013, Rumora and Žanić Grubišić, 2009). Néanmoins, l'hypothèse de l'implication génotoxique directe de l'OTA induisant la formation des

adduits à l'ADN reste toujours en cours de discussion (Pfohl-Leszkowicz and Manderville, 2011). En effet, l'ingestion de cette molécule via le régime alimentaire aboutit à l'apparition de tumeurs hépatocellulaires et rénales, des hépatomes et des nodules hépatiques chez les souris mâles et des carcinomes hépatocellulaires chez les souris femelles (Huff *et al.*, 1992, Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1998). Cependant, les études sur l'association de cancers chez les humains suite à l'ingestion de l'OTA demeurent peu concluantes, bien que des morts dues aux tumeurs du tractus urinaire ont été signalés dans les pays des Balkans (Néphropathie Endémique des Balkans ou BEN), notamment en Bulgarie et Yougoslavie (Feier and Tofana, 2009).

Quant aux effets **néphrotoxiques** de l'OTA, cette dernière a été associée à l'ochratoxicose des poulets et des porcs (néphropathie porcine liée aux mycotoxines, MPN) classée parmi les maladies causant des pertes économiques mondiales (Huff *et al.*, 1974, Elaroussi *et al.*, 2006, Stoev *et al.*, 2010a, Stoev *et al.*, 2010b), et caractérisée par un endommagement sévère des reins lié à la consommation des aliments contaminés en OTA (Stoev and Denev, 2013, Goliński *et al.*, 1984). Cette molécule a montré une grande affinité envers les protéines, plus particulièrement le sérum d'albumine (la Bovine Sérum Albumine ou BSA), favorisant ainsi sa bioaccumulation dans les organes des animaux, et par la suite sa transmission vers les animaux prédateurs. Par conséquent, les muscles, les produits des abats, le lait et parfois les œufs, peuvent être contaminés indirectement par l'OTA. Quant à l'intoxication des humains par cette toxine, il s'est avéré que cette dernière est responsable de la maladie rénale progressive (Néphropathie Endémique ou EN) se manifestant par une fibrose cellulaire interstitielle, une atrophie tubulaire et une caryomégalie des cellules tubulaires rénales (Stoev, 1998, Maaroufi *et al.*, 1993).

L'OTA a aussi des effets **tératogénique, immunotoxique et neurotoxique**. Effectivement, cette substance est capable de traverser la membrane du placenta chez les rats, les souris et les poules, induisant des malformations et des dysmorphogenèses fœtales chez ces animaux (Maruya *et al.*, 1982, Hayes *et al.*, 1974, Gilani *et al.*, 1978). En

plus, sous certaines conditions, l'OTA peut agir comme un agent immunodépresseur, inhibant par la suite la prolifération des lymphocytes B et T ainsi que la production de l'Interleukine 2 (IL2) (Lea *et al.*, 1989). De même, Petzinger and Weidenbach (2002) a constaté que l'OTA est à l'origine de plusieurs maladies immunitaires, notamment la régression du thymus, la suppression de la réponse immunitaire et des troubles dans la circulation lymphatique (lymphopénie). Par rapport au système nerveux, l'OTA est considérée comme une substance hautement toxique pour les cellules nerveuses (Brown *et al.*, 1976) causant des lésions et des endommagements au niveau cérébral (Soleas *et al.*, 2001).

Les doses létales (LD) et le mécanisme d'action de l'OTA ont été largement étudiés et interprétés au cours des années, surtout sur les porcs et les rats. Les LD₅₀ de l'OTA (doses létales capables de tuer 50% de la population étudiée) chez les porcs sont de l'ordre de 1.0–6.0 mg/kg, et de 20–30 mg/kg pour les rats (O'Brien and Dietrich, 2005). Ces auteurs ont ainsi démontré que ces taux d'OTA causent des hémorragies dans tous les organes vitaux, des néphroses et nécroses dans le foie et les tissus lymphoïdes. En plus, cette toxine peut s'accumuler dans le corps, puisqu'elle est facilement absorbée par l'estomac et l'intestin grêle, mais difficilement éliminée par les voies biliaires. Une fois ingérée, l'OTA a une durée de demi-vie variable selon le genre des animaux. La durée de demi-vie de cette toxine chez les êtres humains peut arriver à 35 jours (la durée de demi-vie la plus élevée), et à 40 heures chez les rats (la durée la plus petite) (O'Brien and Dietrich, 2005). La demi-vie élevée de l'OTA chez certains organismes est due à l'affinité de cette molécule avec les protéines sériques. Kumagai (1985) a constaté que les rats dépourvus d'albumine sont capables d'éliminer plus rapidement l'OTA par les voies urinaires que les rats témoins.

Quant aux métabolites issus de la transformation de l'OTA, leur toxicité est très peu étudiée. En effet, l'OT α est 1000 fois moins毒ique que l'OTA (Bruinink *et al.*, 1998) et sa demi-vie est de 9.6 heures chez les rats (Li *et al.*, 1997). De même, l'administration de l'OTB n'a pas d'effet néfaste chez les rats (Mally *et al.*, 2005),

pourtant des nécroses et des dégénérations tubulaires rénales sont observées après l'ingestion de la même dose d'OTA par ces rats. Cette différence de toxicité est attribuée à la faible affinité de l'OTB envers les protéines sériques, ce qui diminue sa bioaccumulation dans les organes et favorise ainsi son excréition.

B.VI. Voie de biosynthèse

Bien que l'OTA soit parmi les mycotoxines les plus menaçantes à la sécurité des aliments, sa voie de biosynthèse reste jusqu'à présent, pas complètement élucidée comparée aux autres mycotoxines (Huffman *et al.*, 2010). Néanmoins, plusieurs hypothèses ont été mises au cours des années sur la chronologie de la production de l'OTA :

- En 1979, Huff and Hamilton (1979) ont proposé en premier un schéma hypothétique de cette voie de biosynthèse au niveau biochimique (**Figure 6**). Ces auteurs ont spéculé que la melleine, catalysée par une PKS (Polykétide Synthase), est transformée en 7-methylmelleine et puis en OT β sous l'action d'une oxydase, puis convertie en OT α par l'intermédiaire d'une halogénase/chloroperoxydase. Cette étape est suivie par la liaison entre l'OT α et le phénylalanine-ester (issu de la voie de biosynthèse de l'acide shikimique), engendrant ainsi l'obtention de l'OTC. Ce dernier est par la suite modifié et transformé en OTA suite à une réaction de désestérfication.

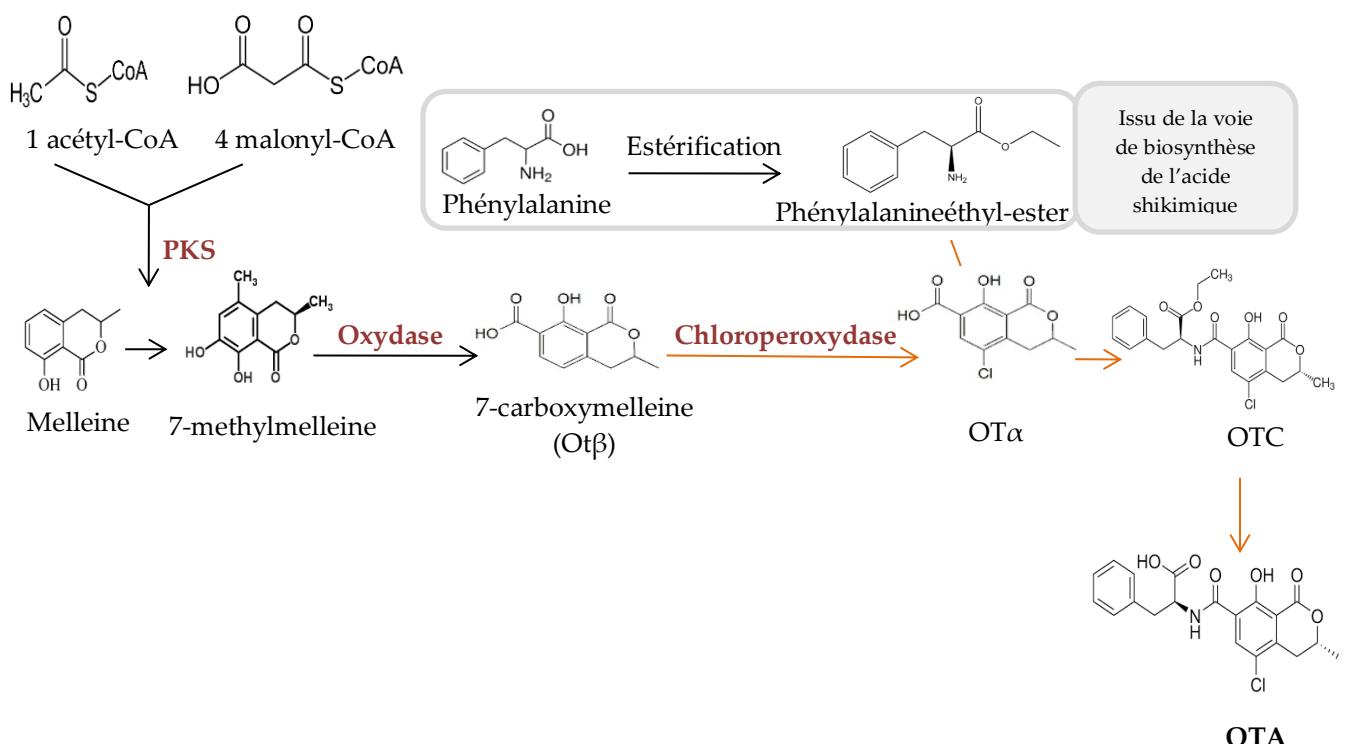


Figure 6 : Schéma de la première voie hypothétique de la biosynthèse de l'OTA.

Schéma adapté et modifié de (Huff and Hamilton, 1979).

- Entre les années 2001 et 2012, des études moléculaires ont montré que chez *A. ochraceus* (Harris and Mantle 2001) et *A. westerdijkiae* NRRL 3174 producteur d'OTA (anciennement identifié comme *A. ochraceus*) (Bacha *et al.*, 2009, Bacha *et al.*, 2012, Harris and Mantle, 2001), la melleine ne joue aucun rôle dans la biosynthèse de cette toxine. Outre melleine, l'intermédiaire OTC, qui est supposé avoir un rôle dans la dernière étape de biosynthèse de l'OTA, n'a pas été détecté dans les cultures d'*A. carbonarius* liquide, et c'est ainsi que l'hypothèse de son implication dans la biosynthèse de l'OTA a été éloigné par Gallo *et al.* (2012).
- Ultérieurement, Gallo *et al.* (2012) a proposé un nouveau modèle présentant la voie de biosynthèse de l'OTA chez *A. carbonarius*, dans lequel l'OT β est transformée en OTB par une NRPS (Peptide Synthase Non Ribosomique) (suite à une liaison amidique entre l'OT β et le L-phénylalanine), et puis en OTA par l'intermédiaire d'une halogénase/chloroperoxydase. D'ailleurs, dans ce modèle

de biosynthèse, l'OT α n'est plus considérée comme un intermédiaire de synthèse chez *A. carbonarius* ITEM 5010, mais plutôt comme un produit de dégradation de l'OTA.

- En 2016, la voie de biosynthèse de l'OTA a été confirmée suite à l'identification et au séquençage du gène codant une halogénase/chloperoxydase chez *A. carbonarius*. La mutation de ce gène a engendré la production excessive de l'OTB, sans aucune détection de l'OTA. Les métabolites qui précèdent la formation de l'OTB ont été de même détectés, ce qui place la chloration en dernière étape dans la voie de biosynthèse de l'OTA (Ferrara *et al.*, 2016).

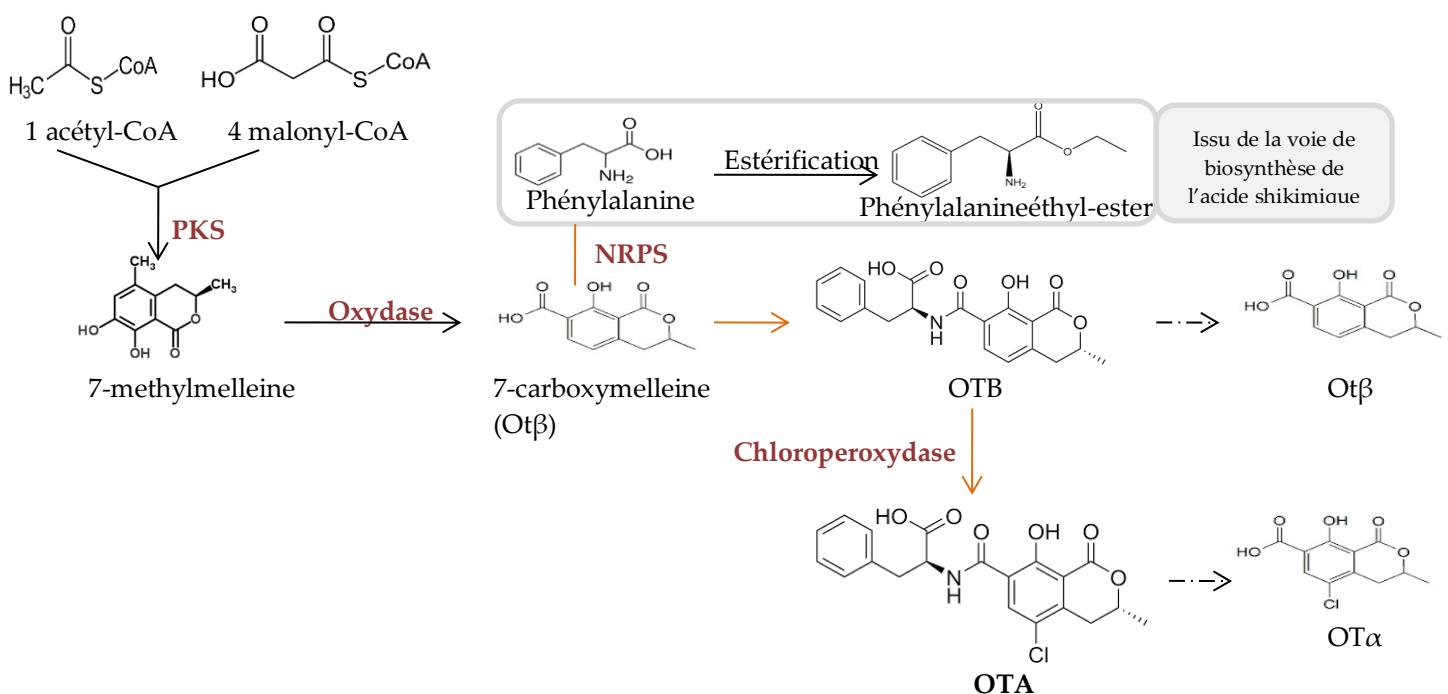
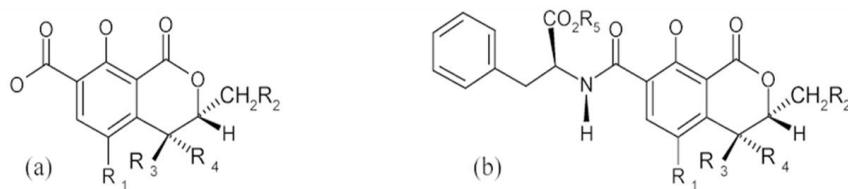


Figure 7 : Schéma montrant la voie de biosynthèse de l'OTA proposée en 2016 chez *A. carbonarius*. Schéma adapté et modifié de Ferrara *et al.* (2016).

Les structures chimiques des intermédiaires de la production de l'OTA, tel que l'OTB et l'OT β , ainsi que l'OT α (produit de dégradation de l'OTA) sont représentées dans la **Figure 8**.



| Structure | Composé | Identité du radical R | | | | |
|-----------|-------------|-----------------------|----|----|----|---------------------------------|
| | | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 |
| (a) | OT α | Cl | H | H | H | - |
| (a) | OT β | H | H | H | H | - |
| (b) | OTA | Cl | H | H | H | H |
| (b) | OT B | H | H | H | H | CH ₃ CH ₂ |

Figure 8 : Structure chimique des métabolites de l'OTA

1. Gènes de la biosynthèse de l'OTA chez *A. carbonarius*

Les PKS les NRPS ont été identifiées comme étant des enzymes à plusieurs modules, impliquées dans la biosynthèse des polykétides et des peptides respectivement, essentielles à la production des métabolites secondaires chez les champignons filamentueux (Gallo *et al.*, 2013). La chloroperoxydase responsable de l'ajout d'un atome de chlore présent dans l'OTA a été de même identifié chez plusieurs souches ochratoxinogènes (Figure 9). Les gènes de biosynthèse de l'OTA chez *A. carbonarius*, ainsi que les propriétés des enzymes codées sont représentés dans les Tableaux 5, 6 et 7.

a. Polykétides Synthases de l'OTA

La famille des polykétides regroupe les métabolites dérivant de la condensation répétitive des unités d'acétates (-CH₂-CO-) par l'intermédiaire des enzymes connues sous le nom des « polykétides synthases » ou « PKS ».

Tableau 5: Caractéristiques des PKS dans le règne fongique, et chez *A. carbonarius*

| | |
|---|---|
| Gène identifié chez <i>A. carbonarius</i> | • <i>acOTApks</i> (PI no. 173482) constitué de 8 063 bp, a été séquencé en 2014 par (Gallo, Knox <i>et al.</i> 2014). |
|---|---|

**PKS chez
*A. carbonarius***

- Domaines : KS (β -kétosynthase), AT (acyltransférase), DH (déhydratase), C-Met (C-methyltransférase) responsable de l'ajout du group méthyle à la molécule de l'OTA.
- Le C-terminal contient les domaines ER (enoylréductase), KR (kétoréductase) et ACP (porteur des précurseurs acyl-CoA)
- Type : PKS hautement réduite ou « HR-PKS »

b. Peptides Synthases Non Ribosomiques (NRPS)

Les NRPS fongiques sont des enzymes multifonctionnelles composées de modules enzymatiques utilisés pour allonger la chaîne d'acides aminés (**Tableau 6**). Chez les NRPS, le nombre et l'ordre des modules représentent le nombre et l'ordre des acides aminés trouvés dans le produit final (Schwarzer and Marahiel, 2001, Amoutzias *et al.*, 2008).

Tableau 6 : Caractéristiques des NRPS dans le règne fongique, et chez *A. carbonarius*

| | |
|--|--|
| Gène identifié chez <i>A. carbonarius</i> | • <i>acOTAnrps</i> , constitué de 5 691 bp (PI no. 132610) (Gallo <i>et al.</i> , 2012). |
| NRPS chez <i>A. carbonarius</i> | • Constituée de 1 875 acides aminés et caractérisée par la présence de trois domaines centraux ou « Core Domains » ainsi qu'un domaine d'adénylation |

c. Halogénase/chloroperoxydase

L'intervention d'une choloroperoxydase dans la voie de biosynthèse de l'OTA a été supposée d'après la structure chimique de cette toxine (Huff and Hamilton, 1979). La première preuve de l'implication de cette enzyme a été rapportée chez *P. nordicum* suite à la détection du gène *otachlPN* codant une halogénase. Dans cette étude menée sur ce champignon, 30 gènes activés ont été détectés durant la synthèse de l'OTA, quand ce champignon est mis en culture dans des conditions favorisant cette production (Färber and Geisen, 2004, Karolewicz and Geisen, 2005). Dernièrement, une halogénase/chloroperoxydase a été identifiée chez *A. carbonarius* par Ferrara *et al.* (2016) qui a pour rôle d'ajouter un atome de chlore à l'OTB (anologue non chloré de l'OTA) afin d'aboutir à la structure finale de l'OTA, portant un atome de chlore sur son carbone C5 (Tableau 7).

Tableau 7 : Caractéristiques de l'halogénase/chloroperoxydase chez *A. carbonarius*

| | |
|--|--|
| Gène identifié chez <i>A. carbonarius</i> | <ul style="list-style-type: none"> • <i>acOTAHal</i> (ID 209543) constitué de 1 548 bp |
| Chloroperoxydase chez <i>A. carbonarius</i> | <ul style="list-style-type: none"> • Elle se situe à 4 400 nucléotides en aval du locus contenant les gènes <i>acOTApks</i> et <i>acOTAnrps</i>. • La délétion du gène a induit un arrêt total de la production de l'OTA chez <i>A. carbonarius</i> d'une part, et une augmentation significative dans la production de l'OTB d'une autre part. • L'étape de chloration (qui convertit l'OTB en OTA) représente l'étape finale de la voie de biosynthèse de l'OTA chez <i>A. carbonarius</i>. |

d. Gènes *acOTAbZIP* et *acOTAp450* impliqués dans la voie de biosynthèse de l'OTA chez *A. carbonarius*

L'inspection des régions en amont et aval du cluster de l'OTA contenant les gènes *acOTApks*, *acOTAnrps* et *acOTAHal* a permis d'identifier plusieurs gènes chez *A. carbonarius* codant pour des protéines putatives impliquées dans la biosynthèse de l'OTA. En effet un profil d'expression similaire à celui d'*acOTAHal* a été observé pour *acOTAp450* et *acOTAbZIP*, deux gènes situés entre *acOTAnrps* et *acOTAHal* (Figure 9). Les *acOTAp450* et *acOTAbZIP* codent pour une monooxygénase cytochrome p450 (ID 517149) et un facteur de transcription bZIP (ID 7821). L'implication d'une monooxigénase p450 dans la biosynthèse de l'OTA a déjà été identifiée chez *A. ochraceus* (O'Callaghan *et al.*, 2006) et *A. steynii* (Gil-Serna *et al.*, 2015) (Tableau 8), probablement ayant la fonction d'oxydase impliquée dans la formation du métabolite OTβ. Le facteur de transcription bZIP a un rôle dans la régulation de l'expression des gènes de biosynthèse de l'OTA. En effet, les protéines bZIP sont des facteurs de transcription qui régulent de multiples processus métaboliques tels que le développement et la morphologie des champignons ainsi que la réponse à un stress oxydatif (Yin and Keller, 2011).

Les données collectées sur la voie de biosynthèse de l'OTA ainsi que sur les gènes impliqués dans cette synthèse, ont permis d'établir des clusters hypothétiques pour uniquement *A. carbonarius*, *A. steynii*, *A. niger* et *P. nordicum* (Figure 9).

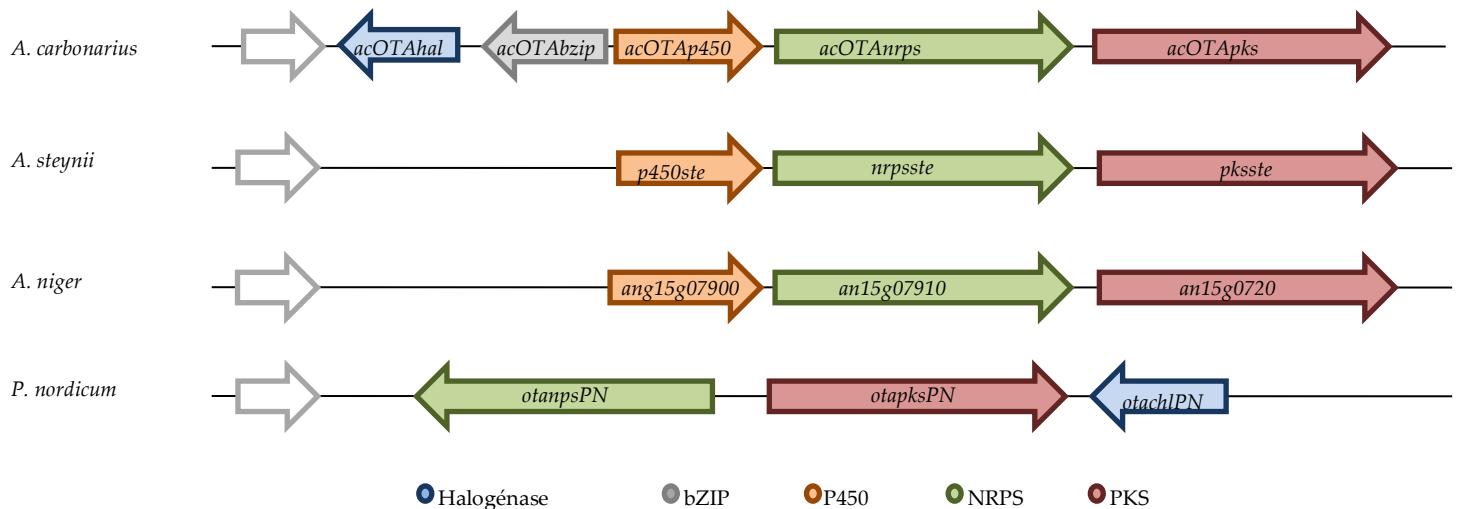


Figure 9 : Représentation schématique des différents clusters hypothétiques de la voie de biosynthèse de l'OTA chez *A. carbonarius* (Ferrara *et al.*, 2016), *A. steynii* (Gil-Serna *et al.*, 2015), *A. niger* et *P. nordicum* (Karolewiez and Geisen, 2005).

Cette comparaison montre que chez le champignon *P. nordicum* appartenant au genre *Penicillium*, l'arrangement de ses gènes de biosynthèse de l'OTA est différent que celui observé chez les espèces ochratoxinogènes appartenant au genre *Aspergillus*.

Tableau 8: Gènes de biosynthèse de l'OTA identifiés chez les producteurs majeurs de l'OTA (N.I. : non identifié)

| | PKS | NRPS | Halogénase | Cytochrome P450 | bZIP |
|-----------------------|---|---|---|---|---|
| <i>A. carbonarius</i> | acOTApks | acOTAnrps | acOTAhal | acOTAp450 | acOTAbZIP |
| | 8 063 bp PI no. 173482 (Gallo <i>et al.</i> , 2014) | 5 691 bp PI no. 132610 (Gallo <i>et al.</i> , 2012) | 1 548 bp ID 209543 (Ferrara <i>et al.</i> , 2016) | Identifié, non séquencé (Ferrara <i>et al.</i> , 2016) | Identifié, non séquencé (Ferrara <i>et al.</i> , 2016) |
| | | | | | |
| | | | | | |

| | PKS | NRPS | Halogénase | Cytochrome P450 | bZIP |
|-------------------------|--|--|---|---|-------------|
| <i>A. westerdijkiae</i> | <i>aoks1</i> 2 017 bp Acc no. AY583209.1 (Bacha <i>et al.</i> , 2009) | <i>nrps</i> Séquence partielle 902 bp (Sartori <i>et al.</i> , 2014) | N.I. | <i>p450-B03</i> 463 bp Acc no. DQ054596 (O'Callaghan <i>et al.</i> , 2006, Bacha <i>et al.</i> , 2009) | N.I. |
| <i>A. niger</i> | <i>An15g07920</i> 7 665 bp Acc no. XM_001397276.2 (Ferracin <i>et al.</i> , 2012) | <i>An15g07910</i> 5 643 bp Acc no. XM_001397275 .2 (Ferracin <i>et al.</i> , 2012) | <i>radH</i> 1 494 bp acc. no. XP_001397309 (Ferracin <i>et al.</i> , 2012) | <i>An15g07900</i> 1 530 bp Acc no. XM_001397274.1 (Ferracin <i>et al.</i> , 2012) | N.I. |
| <i>A. ochraceus</i> | <i>aopks</i> 1 508 bp Acc no. AY272043 (O'Callaghan, 2003) | N.I. | N.I. | <i>p450-H11</i> et <i>p450-B03</i> Identifiés, non séquencés (O'Callaghan <i>et al.</i> , 2006) | N.I. |
| | <i>aoOTApks</i> Identifié, non séquencé (Wang <i>et al.</i> , 2015) | | | | |
| | <i>aolc35-12</i> 3 412 bp Acc no. AY583208.1 (Bacha <i>et al.</i> , 2012) | | | | |

| | PKS | NRPS | Halogénase | Cytochrome P450 | bZIP |
|----------------------|--|----------------------------------|-------------------------------|--|-------------|
| <i>A. steynii</i> | <i>pksste</i> | <i>nrpsste</i> | N.I. | <i>p450ste</i> | N.I. |
| | 8095 | 5166 | | 1822 | |
| | Acc no. | Acc no. | | Acc no. | |
| | KJ395384.1 | KJ395384.1 | | KJ395384.1 | |
| | (Gil-Serna <i>et al.</i> , 2015) | (Gil-Serna <i>et al.</i> , 2015) | | (Gil-Serna <i>et al.</i> , 2015) | |
| <i>P. verrucosum</i> | <i>otapksPV</i> | <i>nrps</i> | N.I. | N.I. | N.I. |
| | 1080 bp | 699 bp | | | |
| | Acc no. | Acc no. | | | |
| | DQ789993 | JN097798.1 | | | |
| <i>P. nordicum</i> | (Abbas <i>et al.</i> , 2013) | (Rodríguez <i>et al.</i> , 2011) | | | |
| | <i>otapksPN</i> | <i>otanpsPN</i> | <i>otachlPN</i> | N.I. | N.I. |
| | 2 226 bp | 2 138 | 951 bp | | |
| | Acc no. | Acc no. | Séquence non accessible | | |
| | AY196315 | AY534879 | (Geisen <i>et al.</i> , 2006) | (Geisen <i>et al.</i> , 2006, Färber and Geisen, 2004) | |
| | (Karolewicz and Geisen, 2005, Geisen <i>et al.</i> , 2004) | | | | |

2. Régulateurs de la voie de biosynthèse de l'OTA

L'activation ou la répression des gènes de biosynthèse des ochratoxines dépend d'un certain nombre de facteurs agissant sur la synthèse de ces métabolites. En général, la plupart des clusters de métabolites secondaires sont régulés par des facteurs de transcriptions internes et/ou globaux, contrôlés par différents stimuli physiologiques et environnementaux. La biosynthèse de l'OTA, elle aussi, est gouvernée par des facteurs de transcriptions globaux activés suite à différents stimuli externes (lumière, pH, azote, carbone et stress oxydatif).

a. La lumière et le complexe velvet, régulateurs de la production de l'OTA

Parmi les stimuli influençant la production des mycotoxines, la lumière fait partie des facteurs environnementaux essentiels à cette production. Selon Bayram *et al.*

(2008), la présence ou l'absence de la lumière induit une différentiation morphologique des champignons, et c'est seulement en l'absence de la lumière que les moisissures produisent des métabolites secondaires. La formation des conidies, la croissance mycéliale et la production de l'OTA peuvent être influencées par la lumière blanche et l'U.V chez *A. ochraceus* et *A. niger*. En fait, la lumière rouge ($\lambda = 627$ nm) et la lumière bleue ($455 < \lambda < 470$ nm) induisent une inhibition de la croissance fongique et de la production de l'OTA (Fanelli *et al.*, 2012, Schmidt-Heydt *et al.*, 2011b, Aziz and Moussa, 1997). Afin de mieux comprendre ce phénomène, un complexe velvet « VelB/VeA/LaeA » a été largement décrit, contenant des domaines conservés tout au long du règne fongique (Bayram and Braus, 2012). Ce complexe est localisé principalement dans le noyau en absence de lumière (Bayram *et al.*, 2008). En présence de lumière, le VeA est localisé dans le cytoplasme et le VelB favorise la formation de spores asexuées. En obscurité, le complexe VelB / VeA est transporté vers le noyau et provoque une augmentation de l'activité du LaeA, un régulateur épigénétique principal pour le métabolisme secondaire dans le genre *Aspergillus* (**Figure 10**) (Bok and Keller, 2004).

Quant aux gènes de régulation, *veA* et *laeA* chez *A. carbonarius* ont été identifiés en 2013 par Crespo-Sempere *et al.* (2013). Ces gènes codent respectivement pour deux protéines appelées VeA (PI no. 202676) et LaeA (PI no. 5941). En effet, suite à l'inactivation de ces gènes chez *A. carbonarius*, la croissance végétative est touchée d'une manière non significative, cependant, une réduction significative dans la production des conidies est remarquée (Crespo-Sempere *et al.*, 2013). En d'autres termes, la production des conidies a augmenté en présence de lumière chez *A. carbonarius*, tandis que la production de l'OTA est significativement amplifiée en obscurité. Malgré les taux de production variés, suite à la présence ou l'absence de lumière, les niveaux de transcription du *veA* et du *laeA* demeurent les mêmes, indépendamment du stimulus lumineux, ce qui signifie que la production de l'OTA

dépend seulement de la position du VeA dans la cellule et non pas des taux de transcription des gènes régulateurs (Crespo-Sempere *et al.*, 2013).

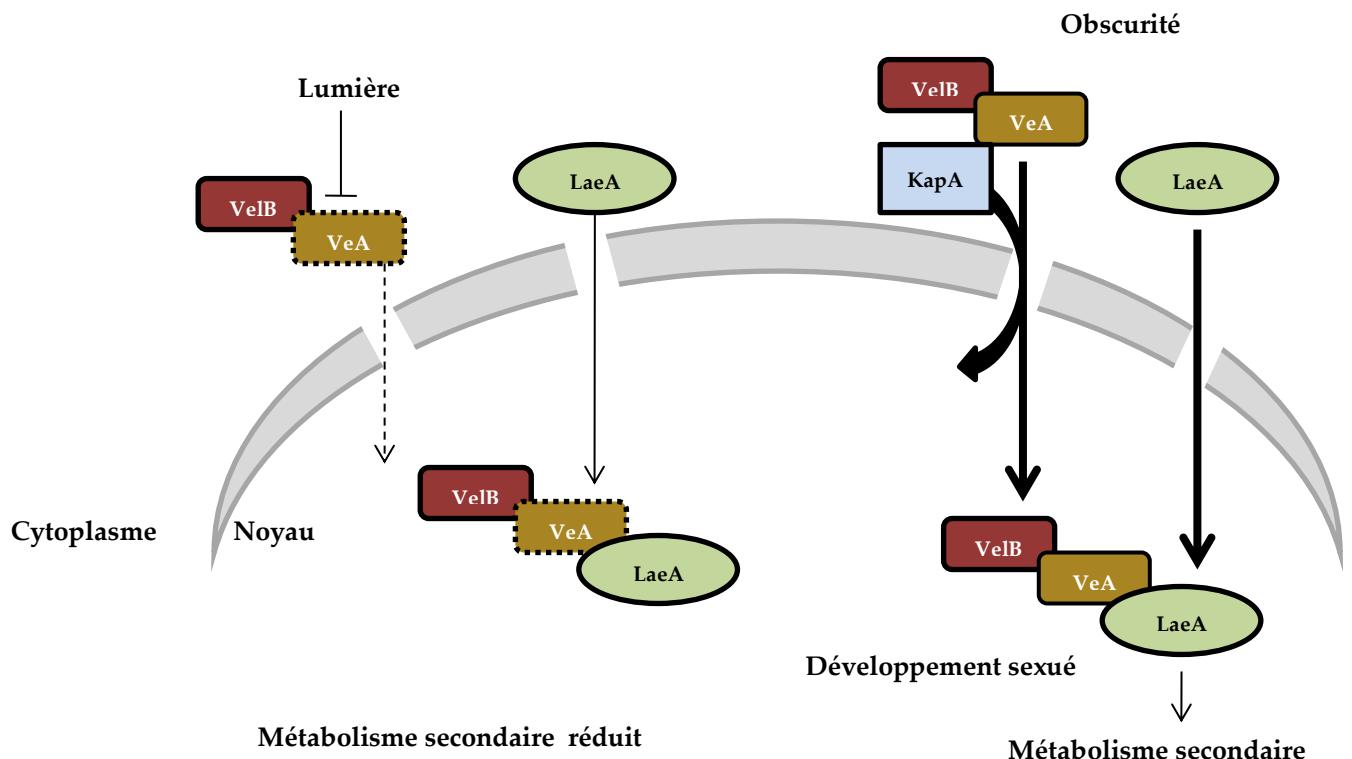


Figure 10 : Interaction entre les complexes de la famille « velvet » et la protéine LaeA chez *A. nidulans*. (KapA : protéine de transport)

Schéma adapté et modifié de Bayram and Braus (2012)

b. Les molécules oxydantes et le stress oxydatif

Lors d'un stress oxydatif, les champignons filamentueux se protègent en activant plusieurs lignes de défense, afin de prévenir des dommages cellulaires causés par l'apparition des espèces réactives de l'oxygène (ROS). La première ligne de défense est représentée par l'activation des enzymes anti-oxydantes (supéroxyde dismutases, catalases et peroxydases).

- Les supéroxydes dismutases(SOD) catalysent la transformation du supéroxyde en peroxyde (H_2O_2)
- Les catalases détoxifient et transforment le H_2O_2 en H_2O et O_2 (Hong *et al.*, 2013).

- Les peroxyredoxines (PRX), agissent comme des peroxydases cellulaires ayant un rôle protecteur des protéines contre les ROS (Rhee *et al.*, 2012).

Une modulation dans l'expression des *sod* et *prx* chez *A. carbonarius* est observée suite à un ajout des antioxydants (BHT et catéchine). En effet, une concentration de 2.5 mmol/L de BHT induit une réduction dans l'expression de ces gènes suivie d'une diminution des taux d'OTA. Cependant, l'emploi des concentrations supérieures à 2.5 mmol/L de BHT provoque une augmentation des ROS dans le milieu de culture, ce qui induit une production élevée de l'OTA (Crespo-Sempere *et al.*, 2016).

D'autres mécanismes sont de même impliqués dans la régulation de la synthèse des mycotoxines tels que les récepteurs liés au stress oxydatif. Ces récepteurs peuvent transmettre le "message oxydatif" vers le noyau et favoriser un changement de transcription visant à restaurer l'équilibre redox correct dans la cellule. Par exemple la production des ochratoxines et des aflatoxines est régulée par le facteur de transcription du stress oxydatif « Yap-1 » (Reverberi *et al.*, 2012, Reverberi *et al.*, 2007). Chez *A. parasiticus*, la délétion du gène *ApyapA* (un homologue du *Yap-1* présent chez les levures) désactive la capacité du champignon à rétablir l'équilibre redox correct dans la cellule. Par la suite, le métabolisme secondaire et la synthèse des aflatoxines sont déclenchés. De même, l'hypothèse de l'implication du stress oxydatif dans la régulation de la synthèse de l'OTA chez *A. ochraceus* a été confirmée suite à par la rupture du gène *AyloxA*, codant une lipoxygenase chez ce champignon (Reverberi *et al.*, 2012). L'inactivation de ce gène induit un changement dans les phénotypes des colonies et la formation des conidies, une diminution de l'activité de la lipoxygenase, et une inhibition significative de la production d'OTA chez *A. ochraceus*. Le stress oxydatif affecte non seulement la production de cette toxine, mais aussi peut induire la production de la citrinine à la place de l'OTA, révélant ainsi le phénomène de « cross-regulation » de la voie de biosynthèse OTA/citrinin chez *P. verrucosum* (Schmidt-Heydt *et al.*, 2015).

c. Les facteurs nutritifs : source de carbone et d'azote

Les champignons préfèrent les sources de carbone facilement métabolisables par rapport à d'autres sources d'hydrocarbures. En effet, le carbone facilement métabolisé réprime la synthèse des enzymes liées au catabolisme des autres hydrocarbures, assurant ainsi une utilisation préférentielle de la source de carbone pour chaque espèce. Ce mécanisme connu sous le nom de « répression du carbone » a été bien étudié chez *A. nidulans* et *A. niger* et implique la protéine réprimante connue sous le nom de « CreA » (Ruijter and Visser, 1997). En présence de glucose, CreA inhibe la transcription de nombreux gènes cibles en se liant à la séquence consensus spécifique de G / CPyGGG dans la région promotrice de ces gènes (Ronne, 1995). Les gènes liés au métabolisme secondaire tels que l'*ipnA* (impliqué dans la biosynthèse de la pénicilline chez *A. nidulans*) appartiennent à la catégorie des gènes influencés par CreA (Martín *et al.*, 1999). Depuis sa découverte, le *creA* a montré son implication dans la régulation de l'utilisation de la proline, l'éthanol et le xylène chez *A. nidulans* (Ruijter and Visser, 1997). Dans son étude, Hashem *et al.* (2015) a évalué la croissance d'une souche d'*A. carbonarius* mise en culture avec plusieurs sources de carbone ainsi que sa capacité à produire l'OTA dans ces conditions (Tableau 9). Cet auteur a trouvé que l'emploi du fructose, glucose et sucre n'entraîne pas une différence significative dans la croissance d'*A. carbonarius* ni dans la production de l'OTA par ce champignon. Par contre, le glycérin, la cellulose et la pectine réduisent significativement la croissance fongique. La production de l'OTA est affectée suite à l'emploi du mannose, glycérin, amidon et pectine.

Tableau 9 : Effet de plusieurs sources de carbone sur la croissance d'*A. carbonarius* et la production de l'OTA

| Source de carbone | Croissance (g / 100 mL) | Production d'OTA ($\mu\text{g} / 100 \text{ mL}$) |
|-------------------|-------------------------|---|
| Fructose | 1.92 | 69.48 |
| Glucose | 2.00 | 56.23 |
| Sucrose | 2.06 | 56.17 |
| Mannose | 0.63 | 33.35 |

| | | |
|-----------|------|-------|
| Glycérol | 0.29 | 18.53 |
| Cellulose | 0.42 | 56.00 |
| Amidon | 0.73 | 13.26 |
| Pectine | 0.31 | 28.03 |

De même Hashem *et al.* (2015) a étudié l'effet de différentes sources d'azote sur la croissance et la production de l'OTA, et il a trouvé que l'emploi de l'extrait de levure et de nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) est optimal pour la croissance de ce champignon et la production de l'OTA. Par contre, le chlorure d'ammonium (NH_4Cl), l'urée ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) et le sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ne favorisent pas la production de l'OTA ni la croissance du champignon.

d. Effet du pH du milieu

Les champignons comme beaucoup d'autres microorganismes, sont capables de s'adapter aux changements environnementaux. Plus particulièrement, les moisissures peuvent se développer et s'adapter à des pH extrêmes. Ce phénomène a été étudié chez plusieurs classes de champignons. Face à un changement de pH, ces dernières sont capables de modifier l'expression de certains gènes, leur permettant de survivre dans une large gamme de pH. Cette réorganisation transcriptomique affecte les gènes impliqués dans la production des molécules destinées à la communication avec le milieu extérieur. En d'autres termes, il s'agit des ligands localisés sur la surface cellulaire ou des enzymes et des métabolites destinés à la sécrétion (Penalva *et al.*, 2008). C'était dans les années 60 que la régulation spécifique au pH a été mise en évidence chez *A. nidulans* suite à l'isolement des mutants appelés « mutant pal » (alkaline phosphatase deficient) et des « mutant pac » (acid phosphatase deficient) (Dorn, 1965). Plus tard, Caddick *et al.* (1986), a démontré que les gènes *palA*, *palB*, *palC*, *palE*, *palF* et *pacC* sont impliqués dans la régulation des voies de biosynthèse des métabolites chez les champignons face aux variations du pH. Ultérieurement, il a été démontré que les produits de traduction des gènes *pal* et *pacC* forment une cascade de signalisation en réponse à la variation du pH extracellulaire qui se termine par la protéine PacC (Penalva *et al.*, 2008). Cette protéine renferme trois motifs de zinc qui

s'attachent à la séquence consensus « 5'-GCCARG » de la région promotrice de gènes chez *A. nidulans* (Tilburn *et al.*, 1995, Espeso *et al.*, 1997).

Plus particulièrement, chez *A. nidulans* et *A. parasiticus*, la production de la stérimatocystine et de l'aflatoxine respectivement a été régulée par le « PacC » pour différentes valeurs de pH (Keller *et al.*, 1997). Ainsi, le pH acide (4-6) induit une expression précoce des gènes *stcU* chez *A. nidulans* et *ver-1* chez *A. parasiticus* comparée à celle en pH basique ou neutre, ce qui induit une production importante de stérimatocystine et d'aflatoxine respectivement. Cependant, chez *A. ochraceus* et *A. carbonarius*, la variation du pH du milieu semble avoir un effet non significatif sur la production de l'OTA, comparé à celui de l'activité de l'eau et la température (Kapetanakou *et al.*, 2009). Ce fait peut être dû à l'absence du site de liaison PacC dans la région promotrice du gène *pks* chez *A. carbonarius*. En effet, dans son étude sur la régulation de la production de l'OTA par des stimulus externes, Thomas B.T. (2015) a trouvé que ce site n'était présent que chez 4 isolats parmi 18 souches d'*Aspergillus* appartenant à la section Nigri et productrices d'OTA. Cette observation pourrait être la raison pour laquelle le pH n'est pas considéré comme un facteur important dans la régulation de la production de l'OTA chez les champignons appartenant à la section Nigri, plus particulièrement *A. carbonarius*.

e. Stress osmotique

A. carbonarius produit généralement des quantités élevées d'OTA, comparées à celles produites par *P. nordicum*. En revanche, *P. verrucosum* ne produit généralement que des quantités modérées d'OTA par rapport à *P. nordicum*. En fait, la production d'OTA par le genre *Penicillium* dépend fortement des conditions environnementales telles que les stress osmotique et oxydatif. Effectivement, *P. verrucosum* est capable de produire la citrinine (métabolite secondaire) au lieu de l'OTA suite à un stress oxydatif (Schmidt-Heydt *et al.*, 2011a), alors que dans un stress osmotique (taux élevé de NaCl) la production de citrinine est déplacée vers l'OTA (Schmidt-Heydt *et al.*, 2012). La biosynthèse et l'excrétion de l'OTA (qui porte un chlore dans sa molécule), peuvent

être considérées comme une sorte d'adaptation aux environnements riches en NaCl. La production excessive de l'OTA dans un milieu riche en NaCl par le genre *Penicillium* est considéré comme un moyen de transport du chlore hors de la cellule, afin d'assurer une certaine homéostasie, favorisant ainsi la survie de ces champignons dans de telles conditions (Schmidt-Heydt *et al.*, 2012).

Contrairement aux deux *Penicillium*, *A. carbonarius* n'a jamais été trouvé dans des environnements riches en NaCl. Ceci indique que ce dernier n'est pas adapté à ce type d'habitat. Les changements dans l'osmolarité du milieu (causés par le NaCl ou les sucres), sont habituellement transmis au niveau transcriptionnel par l'intermédiaire de cascades de signaux. Les champignons ont diverses cascades de signaux, qui sont activées par différents signaux externes (Rispail *et al.*, 2009). La cascade de signaux activée par l'osmolarité élevée, est connue sous le nom « HOG » (High Osmolarity Glycérol) (Rispail *et al.*, 2009). Cette dernière est composée d'un récepteur sensible aux changements d'osmolarité externes, situé au niveau de la membrane et qui transmet le signal vers un ensemble de trois protéines kinases consécutives (MAP kinases), dont la dernière est la protéine kinase HOG (Rispail *et al.*, 2009). La forme phosphorylée de cette kinase est la forme active et peut activer les facteurs de transcription en aval par phosphorylation. Ce mécanisme d'adaptation favorise la production continue d'OTA qui assure la viabilité de l'organisme producteur dans des environnements riches en NaCl. Le mécanisme devrait théoriquement être présent chez tous les organismes producteurs de cette toxine. Cependant, ce n'est pas le cas pour *A. carbonarius*, qui a perdu drastiquement sa capacité de biosynthèse de l'OTA ainsi que son pouvoir de croissance quand il est mis en culture dans un milieu supplémenté de 40 g/L de NaCl (Stoll *et al.*, 2013). Cela peut être dû au fait que la phosphorylation et l'activation de la biosynthèse de l'OTA ne sont pas apparemment couplées chez ce champignon. Ainsi, suite à un stress osmotique causé par le NaCl, *A. carbonarius* semble avoir des difficultés à s'adapter et produire l'OTA dans ces conditions de vie (Stoll *et al.*, 2013).

B. VII. Moyens de lutte contre l'OTA

Prévenir la production de l'OTA est devenue une des préoccupations majeures afin de protéger les consommateurs de ses risques délétères sur leur santé. Les dégâts économiques de l'OTA ainsi que ses effets néfastes sur la santé publique ont incité les scientifiques à trouver des moyens de préventions contre l'apparition de cette toxine aux champs, ainsi que des moyens de détoxification de l'OTA des denrées alimentaires (Rustom, 1997). En effet l'efficacité de ces deux techniques dépend amplement de la méthode utilisée, le moment d'emploi (avant ou après la récolte) et surtout du type de champignons responsables de sa production (Kabak *et al.*, 2006). Les processus de décontamination ainsi que la prévention de l'occurrence de l'OTA doivent répondre aux critères suivants (Kabak *et al.*, 2006) :

- (1) Destruction, inactivation ou élimination de l'OTA
- (2) Aucun résidu toxique, carcinogène ou mutagène ne doit apparaître dans les denrées alimentaires traitées
- (3) Préserver les propriétés physico-chimiques et sensorielles du produit
- (4) Techniquement et économiquement faisable

Ces stratégies peuvent viser soit à limiter le développement fongique (approche préventive), soit agir sur la toxine même afin de l'éliminer ou réduire sa disponibilité (approche curative). Dans le premier cas, l'intervention se fait en général au champ ou dans les silos de stockage afin de mieux contrôler l'infection fongique. Quant à la décontamination des substrats de la toxine, l'intervention se fait après la récolte afin de réduire sa disponibilité en limitant son adsorption par les organismes consommateurs.

1. Les bonnes pratiques agricoles

a. Avant et durant la récolte

Afin de limiter l'apparition d'*A. carbonarius* et d'autres champignons ochratoxinogènes, il faut tout d'abord adopter des bonnes pratiques agricoles dans le

but de défavoriser la dispersion des spores fongiques qui peuvent être présentes dans le sol. Ces pratiques se basent sur la préparation et la fertilisation du sol avant la semée, le désherbage et la rotation des cultures (FAO-WHO, 2013, Magan *et al.*, 2004). A l'heure actuelle, des nouvelles stratégies prometteuses impliquant des méthodes de biotechnologie modernes sont à l'étude (Amézqueta *et al.*, 2009). Ces nouvelles approches pourront être efficaces contre cette problématique, qui consiste en l'utilisation des agents bio-compétitifs non toxinogènes comme des souches d'*A. niger* non productrices d'OTA sur les cultures aux champs (Valero *et al.*, 2007). Cependant, cette stratégie reste problématique vue la possibilité de recombinaison de ces souches avec d'autres souches toxinogènes (Norred, 1999).

Pour prévenir la contamination des grains de café, de céréales et de baies de raisin durant la récolte, il faut tout d'abord s'assurer de la propreté et de la bonne performance de l'équipement agricole et effectuer la récolte quand la teneur en eau des plantes atteint son optimal pour générer le minimum de dommages mécaniques au produit (Joint FAO/WHO Codex Alimentarius, 2003). De même, il faut (1) se débarrasser des grains souillés tombés par terre, afin de prévenir le transport des spores de ces derniers vers les nouveaux fruits récoltés ; (2) La période de récolte joue également un rôle essentiel dans la prévention du développement fongique. Il est recommandé de récolter juste après que la maturité physiologique soit atteinte afin de limiter la contamination par l'OTA et (3) éviter tout contact entre le sol et les fruits semés (FAO, 2009, Bucheli and Taniwaki, 2002).

b. Les conditions de stockage après la récolte

Même si les pratiques agricoles appliquées aux champs et au moment de la récolte sont indispensables à la limitation de la contamination des produits agricoles par des champignons ochratoxinogènes, les conditions de stockage demeurent primordiales afin de limiter et prévenir la production des toxines puisque cette période peut offrir des conditions optimales pour cette production (Température, humidité et absence de lumière) (Norred, 1999). Il a même été suggéré que les grains de café sont rarement

contaminés en OTA durant la période de récolte, et que c'est pendant le stockage et le séchage que la production de l'OTA est déclenchée, surtout si ce processus est réalisé dans des conditions tropicales humides (Bucheli and Taniwaki, 2002). De ce fait, pour limiter ce risque de contamination, il est recommandé de (1) sécher les grains uniquement en couche minces (3 à 5 cm de profondeur) ; (2) faire tourner la semence régulièrement pendant la journée afin d'aérer les grains ; (3) éviter leur réhumidification qui favorise la croissance rapide des champignons et la possibilité de production d'OTA, surtout pour les graines de cacao et de café du à leur hygroscopité (FAO, 2009, Magan and Aldred, 2005) ; (4) garder les produits en stockage qui ont subi un séchage complet et ayant un aw = 0.70 ; (5) maintenir une température de 20 °C pour le stockage des produits emballés et de 2 à 3 °C pour ceux qui ne le sont pas (**Figure 11**) (Joint FAO/WHO Codex Alimentarius, 2003, Bucheli and Taniwaki, 2002) . En plus, le stockage des grains doit avoir lieu dans un endroit propre, sec et à l'abri des infestations d'insectes. Des inspections régulières doivent être aussi effectuées sur les grains en stockages afin de détecter le plus tôt possible le développement fongique et limiter son extension.

La démarche HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Points) est un système d'identification, d'évaluation et de contrôle des dangers significatifs pour la sécurité des aliments. Il s'agit d'une approche structurée et systématique pour le contrôle sanitaire des denrées alimentaires. En effet, deux projets ont eu pour but de mettre en œuvre les systèmes HACCP afin de contrôler l'OTA dans les céréales (OTAP PREV) et le café (Norred, 1999, Olsen *et al.*, 2003). Les points critiques de contrôle contre la contamination en OTA se situent plutôt dans la période de récolte, le séchage et le stockage des produits agricoles.

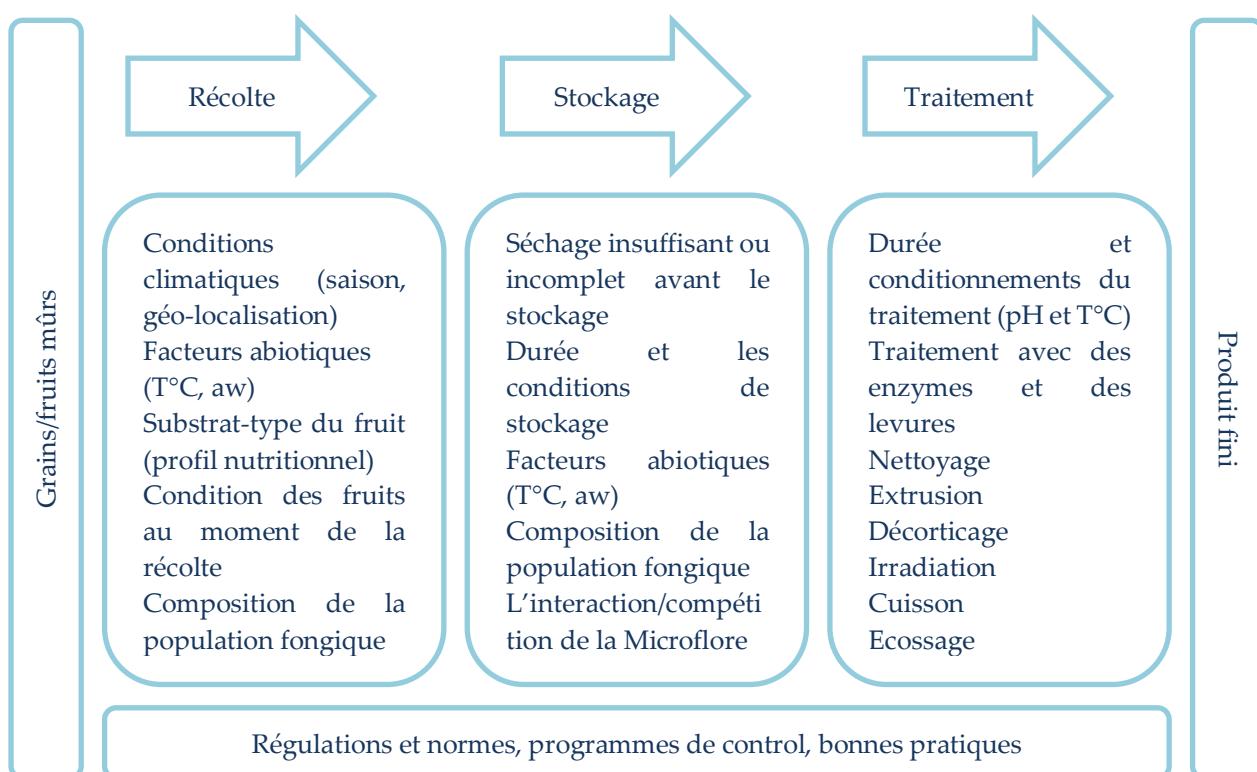


Figure 11 : Pratiques et conditions influençant les teneurs de l’OTA dans les fruits et les grains.

2. Méthodes chimiques

a. Les fongicides

L’emploi de certains pesticides pour contrôler le développement des différents pathogènes semble être une méthode très efficace, ce qui a augmenté l’usage de ces composés depuis les années 1950. Malgré son efficacité, cette stratégie a montré des effets néfastes sur la biodiversité animale et végétale, ainsi que sur les être humains et les mammifères après une exposition prolongée à ces produits, et la perte de son efficacité par l’apparition des organismes résistants à ce traitement.

La stratégie de lutte contre l’occurrence des mycotoxines en utilisant des fongicides semble être la méthode la plus séduisante du point de vue efficacité et vitesse d’action (Norred, 1999). Les fongicides contenant les composés chimiques suivants sont les plus actifs contre la croissance fongique et la production de l’OTA sur les vignes : mepanipyrim, pyrimethanil, fluazinam, iprodione et le mélange cyprodinil/fluodioxonil. Ce dernier a prouvé son efficacité dans plusieurs essais aux

champs, réalisés dans plusieurs pays Méditerranéens, dont la France, l'Espagne, la Grèce et l'Italie (Tjamos *et al.*, 2004, Belli *et al.*, 2007). Dans les régions présentant des risques élevés, un traitement antérieur à la véraison est essentiel afin de lutter au maximum contre la contamination des produits cultivés, préférablement 21 jours avant la récolte. Cependant, l'application de certains fongicides peut induire une augmentation des taux d'OTA même s'ils sont capables de réduire la croissance fongique. A titre d'exemple, les fongicides comme le Carbendazim et le Clorus, qui ont inhibé la croissance d'*A. carbonarius* d'une part, ont induit une augmentation de la production de l'OTA d'une autre part (Medina *et al.*, 2007).

Néanmoins, l'usage des fongicides qui dépasse les normes recommandées provoque des dégâts environnementaux et sanitaires vis-à-vis de la sécurité alimentaire et la santé des organismes consommateurs. Blair (1989) a déclaré qu'une substance chimique modérément inoffensive à de faibles doses, pourra devenir毒ique à de plus fortes doses. Ainsi, la toxicité aiguë des fongicides envers les êtres humains est faible, causant des dermatites allergiques et des irritations de la peau et des muqueuses (Schneider and Dickert, 1994). Quant à la toxicité chronique de ces produits, leurs conséquences sur la santé pourront être graves (effets carcinogènes et mutagènes) suite à une exposition prolongée. De plus, de fortes doses de ces fongicides utilisés en agriculture peuvent induire une toxicité cutanée, des dermatites, des démangeaisons, des allergies et des brûlures (Schneider and Dickert, 1994, Gocmen *et al.*, 1985, Larsen *et al.*, 1990). Par conséquent, l'Union Européen a mis des restrictions, limitant ainsi l'utilisation des fongicides vu leurs effets néfastes sur la santé publique et l'environnement (De Costa and Bezerra, 2009).

b. Procédés chimiques de dégradation de l'OTA

La stratégie de détoxification des denrées alimentaires de l'OTA par des moyens chimiques se base sur l'utilisation des composés chimiques capables de transformer cette toxine en d'autres métabolites. Les méthodes les plus connues sont

l'ammonisation, l'hydrolyse alcaline, l'ozonation, de même que l'utilisation des bisulfites, des acides et des agents oxydants.

Effectivement, l'ammonisation a été adoptée par plusieurs pays grâce à sa capacité à décomposer complètement l'OTA présent dans le maïs, le blé et l'orge (Joint, 2001, Bhatnagar *et al.*, 2003). Même si cette technique n'a pas abouti à la formation et l'accumulation des produits secondaires toxiques, son utilisation altère la nature organoleptique des denrées alimentaires traitées (brunissement des céréales, perte de lysine et d'autres acides aminés) (Joint, 2001, Varga *et al.*, 1996, Huff and Hamilton, 1979). Par conséquent, de nos jours, son utilisation n'est plus recommandée vue ses effets secondaires sur la qualité des aliments traités (Joint, 2001).

En plus, l'hydrolyse alcaline par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'hydroxyde de sodium (NaOH) peuvent également décomposer l'OTA. Cependant leur application *in vivo* demeure impossible vue leurs effets indésirables sur la qualité sensorielle et nutritionnelle des substrats (Joint, 2001).

Une durée de 15 sec de traitement par ozonation (10% O_3), diminue les niveaux d'OTA présents dans les noisettes et les végétaux jusqu'à des seuils non détectables par HPLC (Assante *et al.*, 1977).

Les acides formique, propionique et sorbique ainsi que l'hypochlorite de sodium dégradent l'OTA après 3 à 24h d'incubation (Joint, 2001, Krohn *et al.*, 1997). Même si ces composés chimiques diminuent les teneurs en OTA dans les matrices alimentaires, leur utilisation sur les produits destinés à la consommation humaine est interdite par l'Union Européen (Commision, 2006).

3. Méthodes Physiques

Les méthodes physiques de détoxification consistent au nettoyage, au tri mécanique ainsi qu'à l'irradiation afin d'éliminer les fractions contaminées de l'aliment.

Tout d'abord, le nettoyage commence par un écossage, un épluchage et une élimination des particules de poussière des grains récoltés. Ensuite, le produit nettoyé passe au tri mécanique qui sépare les grains contaminés des grains sains.

Concernant le traitement thermique, l'OTA est une molécule thermiquement stable qui peut survivre aux transformations des aliments, notamment le rôtissage, brassage et la cuisson jusqu'à une certaine limite (Krogh *et al.*, 1974, Scott, 1996). Ainsi, une température de 100 °C ne réduit que 50% l'OTA contaminant le blé même après 10 heures de cuisson (Boudra *et al.*, 1995).

La congélation (-20 °C) et décongélation (26 °C), les traitements par les rayons UV ainsi que l'irradiation- γ peuvent détruire les conidies des champignons filamenteux, mais seule l'irradiation- γ est capable de détruire l'OTA (une dose de 10.0 KGy élimine 88% de l'OTA présente dans le raisin) (Aziz *et al.*, 2004, Debergues *et al.*, 1995, Debergues *et al.*, 1993, Refai *et al.*, 1996, Kanapitsas *et al.*, 2016). Cependant, l'irradiation par des rayons γ n'est autorisée que si les doses ne dépassent pas les 10 KGy (Akueche *et al.*, 2012).

4. Adsorption par des agents physico-chimiques

Une autre approche qui vise à décontaminer les produits agricoles des mycotoxines, se base sur l'utilisation des matériaux adsorbants, qui, une fois présents dans le milieu, se lient aux mycotoxines et les immobilisent afin de les éliminer en fin de compte par une simple filtration. Ces adsorbants peuvent être classés en différents groupes en fonction de leur origine : les minéraux (aluminosilicates), les charbons actifs, les adsorbants biologiques (les parois cellulaires de levures et de bactéries ou les fibres végétales) et les adsorbants synthétiques, y compris les argiles naturelles modifiées et les résines synthétiques (polyvinylpyrrolidone, cholestyramine). Ces matériaux ont été testé afin d'évaluer leur pouvoir à réduire les teneurs en OTA contaminant le vin et le moût du raisin (Visconti *et al.*, 2008, Castellari *et al.*, 2001). Parmi ces adsorbants, le charbon actif et le caséinate de potassium sont les plus

efficace : 90% d'OTA est éliminé du vin rouge en présence du charbon actif et 82% par 150 g/L de caséinate de potassium(Trioné and Dumeau, 2000). Cependant, l'emploi du charbon n'est pas conseillé puisqu'il élimine également les anthocyanes et les autres polyphénols du vin. De même, l'efficacité du traitement avec des fragments de bois de chêne dépend de la quantité de copeaux de bois et de la poudre utilisée (Savino *et al.*, 2007). Selon les résultats d'Olivares-Marín *et al.* (2009), le charbon actif produit à partir de pierres de cerisier pourrait être utilisé pour enlever jusqu'à 50% de l'OTA présente dans le vin, sans causer des changements dans l'indice polyphénolique total et l'intensité de la couleur. D'autres adsorbants, y compris la bentonite, les esters d'acétate de cellulose, la polyvinylpyrrolidone, la cholestyramine et le polygel sont inefficaces pour l'élimination de l'OTA (Visconti *et al.*, 2008, Gambuti *et al.*, 2005, Var *et al.*, 2008).

En conclusion, de nombreux matériaux adsorbants sont testés dans le but de réduire des taux de l'OTA. Cependant, leur activité n'est pas aussi élevée que prévu, à l'exception du charbon actif (Scott, 1996, Espejo and Armada, 2009). En 2005, Tangni *et al.* (2005) a développé une nouvelle fibre végétale insoluble, capable d'adsorber l'OTA présente dans les produits alimentaires liquides. Il existe d'autres matériaux adsorbants prometteurs dans la détoxicification de l'OTA, tels que les zéolithes modifiées (Amézqueta *et al.*, 2009, Daković *et al.*, 2005, Daković *et al.*, 2003) et les bentonites organophiles (Thimm *et al.*, 2001).

5. Les stratégies de bio-contrôle

Les approches physiques et chimiques engendrent des ambiguïtés chez les toxicologues, à cause de leurs effets négatifs sur la qualité des produits finis. De ce fait, une stratégie alternative est proposée pour lutter contre l'occurrence de l'OTA dans les denrées alimentaires, basée sur l'utilisation des méthodes biologiques n'affectant pas la santé humaine ni l'environnement (Bleve *et al.*, 2006). Cette stratégie consiste en l'utilisation des composés naturels issus des plantes (composés phénoliques, huiles essentielles), ainsi que des microorganismes (bactéries lactiques, levures,

actinomycètes) capables de décomposer, transformer et/ou adsorber l'OTA et aussi agir sur la voie de biosynthèse pour réduire partiellement ou complètement la production de cette toxine.

a. Les extraits naturels de plantes : huiles essentielles et composés phénoliques

Les plantes vertes produisent naturellement divers métabolites secondaires tels que les composés phénoliques, les terpenoïdes et les alkaloïdes, afin de se protéger contre les agressions externes (mécanique, biologique ou climatique). Ces composés ont montré au cours des années leur utilité contre les contaminations fongiques et/ou mycotoxiques.

a.1. Huiles essentielles

Découvertes et utilisées depuis des siècles, les huiles essentielles (H.E) sont des métabolites secondaires produits par des plantes, ayant une vaste application dans la médecine traditionnelle, la préservation et l'aromatisation des aliments, ainsi que dans la parfumerie (Kalemba and Kunicka, 2003). Depuis le Moyen Age, les H.E sont amplement utilisées dans les applications bactéricides, virucides, fongicides, antiparasitaires et insecticides (Bakkali *et al.*, 2008). Leur propriété antifongique s'est largement développée au cours des années. En effet, des études approfondies sont réalisées sur leur pouvoir inhibiteur de la croissance fongique et de l'OTA produite par des champignons filamenteux. Cependant, l'évaluation de l'effet antifongique des huiles essentielles contre les champignons ochratoxinogènes, a été menée essentiellement sur *A. ochraceus*, alors que leur impact sur *A. carbonarius* reste très peu élucidé (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Effet des huiles essentielles sur la croissance des champignons ochratoxinogènes. CMF : Concentration Minimale Fongicide

| Huile essentielle | Champignon | Concentration et effet sur la masse fongique | Référence |
|-------------------|-----------------------|--|---------------------------------------|
| Thym | <i>A. ochraceus</i> | 0.5 µL/mL (CMF) | (Soliman and Badeaa, 2002) |
| Basilique | <i>A. ochraceus</i> | 3 µL/mL (CMF) | (Soliman and Badeaa, 2002) |
| Cannelle | <i>A. ochraceus</i> | 500 µL/mL (CMF) | (Hua <i>et al.</i> , 2014) |
| Menthe verte | <i>A. ochraceus</i> | 2 µL/mL (CMF) | (Soliman and Badeaa, 2002) |
| Fenouille | <i>A. ochraceus</i> | 2 µL/mL (CMF) | (Soliman and Badeaa, 2002) |
| Anise | <i>A. ochraceus</i> | >40 µL/mL (CMF) | (Hua <i>et al.</i> , 2014) |
| Cumin | <i>A. ochraceus</i> | 3 µL/mL (CMF) | (Soliman and Badeaa, 2002) |
| Chamomile | <i>A. ochraceus</i> | 3 µL/mL, 71% d'inhibition | (Soliman and Badeaa, 2002) |
| Origan | <i>A. ochraceus</i> | 0.75 µL/mL (CMF) | (Basílico and Basílico, 1999) |
| | <i>A. carbonarius</i> | 0.25 mL/mL, 95.6% d'inhibition | (Kocić-Tanackov <i>et al.</i> , 2012) |
| | <i>A. niger</i> | 0.25 mL/mL, 45.6% d'inhibition | |
| Menthe | <i>A. ochraceus</i> | 1 µL/mL (CMF) | (Basílico and Basílico, 1999) |
| Sauge | <i>A. ochraceus</i> | 1 µL/mL, 30% d'inhibition | (Basílico and Basílico, 1999) |
| Litsée citronnée | <i>A. ochraceus</i> | 500 µL/mL (CMF) | (Hua <i>et al.</i> , 2014) |
| Clou de girofle | <i>A. carbonarius</i> | >3000 µL/mL (CMF) | (Passone <i>et al.</i> , 2012) |
| | <i>A. niger</i> | 3000 µL/mL (CMF) | |

Effectivement, les composants actifs des H.E responsables de leur activité antifongique sont de natures chimiques différentes, tels que les composés phénoliques (eugénol, anethole, carvacrol), les terpènes (carvone), les aldéhydes (cinnamaldéhyde) et les éthers (thymol) (Baydar *et al.*, 2004).

Modes d'action des huiles essentielles

Malgré leurs caractères fongicides et inhibiteurs de l'OTA et de bien d'autres mycotoxines, le mode d'action des H.E. est pauvrement décrit. Pourtant, plusieurs cibles cellulaires potentielles ont été élucidées. Grâce à leur richesse en molécules bioactives, les H.E. sont capables d'agir simultanément sur plusieurs cibles cellulaires. Leurs actions peuvent être situées au niveau de la membrane plasmique des champignons, au niveau des enzymes intracellulaires impliquées dans la respiration cellulaire et la synthèse des protéines structurales, ou bien au niveau de la répression de l'expression des gènes responsables de la biosynthèse de l'OTA (Conner *et al.*, 1984, Kim *et al.*, 2008, Denyer and Hugo, 1991). Tout d'abord, grâce à leur nature lipophile, les H.E. peuvent traverser les **membranes plasmiques** et celles des organites cellulaires, surtout la mitochondrie. Cette incorporation cause un déséquilibre dans la composition lipidique membranaire et une diminution des taux d'ergostérol (lipide membranaire essentiel au développement fongique et l'intégrité de la membrane cellulaire fongique) (Prakash *et al.*, 2015, Barrett-Bee and Dixon, 1994). Les H.E. peuvent aussi agir sur les polysaccharides membranaires, tels que le galactose et le galactosamine (Tatsadjieu *et al.*, 2009). Ces déséquilibres membranaires induisent des fuites des organites et des ions nécessaires à la survie des champignons. En effet, Tolouee *et al.* (2010) a trouvé que la mort des cellules fongiques d'*A. niger* traité à l'H.E. de la camomille est due à l'augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique de ce champignon, entraînant ainsi un déséquilibre osmotique et la fuite des constituants cytoplasmiques.

En second lieu, l'action antifongique des H.E. peut se produire au niveau des **enzymes** responsables de la production de l'OTA tels que le catabolisme du glucose et la peroxydation lipidique. En effet, la synthèse de l'OTA requiert la présence des acétyl-CoA provenant du métabolisme du glucose en pyruvate dans le cytoplasme qui sera transformé ultérieurement en acétyl-CoA au niveau de la membrane mitochondriale (Strijbis and Distel, 2010). L'emploi des H.E. à des cultures fongiques réduit l'activité de MnSOD (ou Sod2), une superoxyde dismutase mitochondriale,

connue pour son rôle primordiale dans la détoxification des radicaux libres produits au cours de la respiration cellulaire (Kim *et al.*, 2006). Cette inhibition entraîne une accumulation des radicaux libres, ce qui réduit la chaîne respiratoire mitochondriale, induisant ainsi au blocage de la synthèse d'acétyl-CoA, précurseur de l'OTA (Prakash *et al.*, 2012).

Dernièrement, les H.E. ont montré un pouvoir régulateur de l'expression des **gènes de biosynthèse** de l'OTA. Récemment, grâce à l'avancement des techniques d'analyse moléculaire, des études sont menées sur la capacité des H.E à inhiber la production de l'OTA en réprimant l'expression des gènes de la voie de biosynthèse de cette toxine. Effectivement, l'ajout de doses croissantes de l'H.E des graines de carambole (AEE) induit une diminution de la production de l'OTA, non proportionnelle à l'inhibition de croissance d'*A. ochraceus* (Murthy *et al.*, 2009). Ainsi, une dose de 50-150 mL/g d'AEE, réduit la production de l'OTA sans nécessairement affecter la croissance fongique. Similairement, un ajout de 75-150 mg/mL de l'H.E du citron peut bloquer complètement la production de l'OTA chez *A. ochraceus*, impliquant que cette réduction n'est pas reliée à l'inhibition de la croissance du champignon, mais à la répression de l'expression des gènes de biosynthèse et/ou de régulation de l'OTA (Hua *et al.*, 2014). Afin de vérifier leur hypothèse, cet auteur a suivi l'expression du gène « *pks* » chez *A. carbonarius* et il a trouvé que son expression est complètement inhibée suite à l'ajout de 75-150 mg/mL de cette H.E. Une étude similaire a montré que l'expression du gène « *acOTApks* » chez *A. carbonarius* est significativement réduite par 0.065 mg/mL des acides hydrocinnamiques, notamment l'acide férule et l'acide paracoumarique (composant actifs de l'H.E de la cannelle) (Ferrara *et al.*, 2015).

a.2. Les composés phénoliques de plantes médicinales

Les plantes et les herbes médicinales, utilisées comme des remèdes contre des troubles bénins, ont été le sujet de plusieurs études, afin de mieux comprendre l'action

de leurs divers composés actifs contre l'occurrence des mycotoxines. Parmi ces éléments actifs, les composés phénoliques semblent avoir un potentiel antifongique et anti-toxinogène le plus intéressant. Le Tableau 11 rassemble les résultats rares de quelques études faites sur l'évaluation des effets fongicides des composés phénoliques extraits de diverses plantes sur des cultures d'*A. carbonarius*.

Tableau 11 : Concentrations minimales fongicides (CMF) de différents composés phénoliques sur des cultures d'*A. carbonarius*

| Extraits phénoliques | Concentrations Minimales Fongicide (CMF) | Références |
|---|---|---------------------------------|
| Acide caféïque | 0.5 mg/mL | (Romero <i>et al.</i> , 2010) |
| Rutine | 250 mg/mL | (Romero <i>et al.</i> , 2009) |
| Quercétine | 250 mg/mL | |
| (3)-tert-Butyl-4-hydroxyanisole (BHA) + n-propyl 4-hydroxybenzoate (PP) | 5.0 + 2.5 mM 10.0 + 2.5 mM 2.5 + 1.0 mM | (Barberis <i>et al.</i> , 2010) |
| Eugenol | 2 µL/mL | (Šimović <i>et al.</i> , 2014) |
| Carvacol | 500 µL/mL | |

En outre, les acides vanillique, gallique et hydroxybenzoïque, considérés comme des agents antioxydants, sont capables de réduire la production de l'OTA ainsi que la croissance de 7 espèces d'*Aspergillus* producteurs de cette toxine, notamment *A. alliaceus*, *A. lanosus*, *A. albertensis*, *A. melleus*, *A. sulphureus*, *A. elegans*, et *A. sclerotiorum*. Cependant, l'acide vanillique n'a pas affecté la croissance d'*A. carbonarius* ni sa capacité à produire de l'OTA (Palumbo *et al.*, 2007).

La structure des composés phénoliques leur permet de pénétrer dans la membrane cellulaire des champignons et d'interférer avec les voies de biosynthèse de l'ergostérol, le glucane, la chitine ainsi que les protéines structurales et les glucosamines chez les champignons filamenteux (Brul and Klis, 1999, Sparraga and Owens, 1999). En plus, Mahoney and Molyneux (2004) ont suggéré que le mode d'action de l'acide gallique repose sur son pouvoir antioxydant, pouvant débarrasser

la cellule des radicaux libres, qui peuvent engendrer un stress oxydatif déclenchant la production des mycotoxines chez les champignons filamenteux. En outre, les composés phénoliques peuvent affecter les champignons ayant acquis une résistance aux traitements antifongiques. Effectivement, les flavonoïdes, la catéchine, les chalconoïdes, les xanthones, les stilbènes, les anthocyanines et les tannins, peuvent franchir la membrane cellulaire et inhiber l'activité des transporteurs ABC (ATP-binding cassettes, qui confèrent aux champignons leur pouvoir résistant aux antifongiques) (You *et al.*, 1995, Meschini *et al.*, 2003). D'autres études montrent que les polyphénols peuvent s'attacher aux protéines cellulaires et changer par la suite leurs structures tertiaires, réduisant ainsi l'activité des transporteurs ABC (Ma and Wink, 2008, Wink and Schimmer, 2010, Wink, 2012).

b. Bio-contrôle par des souches bactériennes

Certains microorganismes ont prouvé leur capacité à prévenir, éliminer et dégrader l'OTA, et ils sont considérés comme étant le moyen de lutte le plus efficace contre l'occurrence de cette toxine dans les denrées alimentaires (Kabak *et al.*, 2006, Amézqueta *et al.*, 2009, Kabak and Dobson, 2009, Sweeney and Dobson, 1998, Halász *et al.*, 2009, Schatzmayr *et al.*, 2003, Petchkongkaew *et al.*, 2008). Lors de l'élaboration du vin, la teneur en OTA augmente jusqu'à l'étape de la fermentation malolactique qui précède l'embouteillage. Normalement, durant cette phase, le taux d'OTA diminue, probablement du à son adsorption sur la surface des levures *Saccharomyces* ou sa dégradation par les bactéries lactiques encore présentes dans le vin (Bejaoui *et al.*, 2004, Cecchini *et al.*, 2006).

b.1. Adsorption de l'OTA sur la surface bactérienne

L'ajout de *Lactobacillus plantarum*, de *S. cerevisiae* et de *S. bayanus* dans le milieu de culture, provoque une baisse significative des taux de l'OTA sans engendrer des métabolites de dégradation, indiquant ainsi la possibilité de l'adsorption de l'OTA sur la membrane cellulaire de ces levures et bactéries lactiques (Silva *et al.*, 2003, Bejaoui *et al.*, 2004). La détoxicification par les levures durant la fermentation alcoolique a été

étudiée et analysée dans de nombreuses études (Petruzzi *et al.*, 2014a, Petruzzi *et al.*, 2015, Cardi *et al.*, 2006, Cecchini *et al.*, 2006, Meca *et al.*, 2010, Bevilacqua *et al.*, 2014). Le contact prolongé entre les levures et le vin durant la vinification, suivi par une diminution de l'OTA, suggère l'implication de ces microorganismes dans le processus de détoxicification. Il s'est avéré que c'est la nature chimique de ces deux éléments qui rend possible cette détoxicification. En effet, la paroi cellulaire de *S. cerevisiae* est composée d'une couche interne de 1,3- β -glycan et 1,6- β -glycan stabilisée par des liaisons d'hydrogène. L'exposition des ces chaînes de polysaccharides ainsi que les mannoprotéines (formant 30 à 40% de la masse de la paroi) à la surface des levures, attribue à ces microorganismes la capacité d'adsorber l'OTA à leur surface (Petruzzi *et al.*, 2014b). De ce fait, les technologies de vinification récentes focalisent sur l'utilisation des fractions de levures mortes afin d'accélérer le processus de détoxicification du vin, sans toucher à ses caractéristiques physico-chimiques et sensorielles (Van der Merwe *et al.*, 1965). Suite à ce sujet, Petruzzi *et al.* (2014b) ont testé deux souches de *S. cerevisiae* mortes (inactivation thermique), ainsi que des parois cellulaires commerciales, afin de comparer leur pouvoir à adsorber l'OTA. Cet auteur a constaté que les parois cellulaires peuvent adsorber jusqu'à 50% de l'OTA, tandis que les levures mortes n'ont adsorbé que 43% de cette toxine. En plus, Bizaj *et al.* (2009) a trouvé qu'il n'y a pas une différence significative entre les levures mortes et vivantes de *S. cerevisiae* dans la détoxicification du vin, prouvant ainsi que ce processus repose uniquement sur l'adsorption l'OTA et non pas sur sa dégradation par cette levure.

b.2. Dégradation de l'OTA par des bactéries

Des études menées sur *Acinetobacter calcoaceticus* ont révélé que cette dernière peut dégrader l'OTA et la transformer en OT α sous l'effet d'une estérase extracellulaire produite par cette bactérie (Hwanga and Draughon, 1994). En réalité, la majorité des microorganismes qui dégradent l'OTA sont capables de cliver la phénylalanine de cette toxine, provoquant l'accumulation de l'OT α dans le milieu réactionnel. Les similarités des profils de dégradation de l'OTA par des souches de *Bacillus* et des

souches non ochratoxicogéniques d'*A. niger* et la détection du produit de dégradation OT α , suggèrent l'implication d'une carboxypeptidase A responsable de cette transformation (Petchkongkaew *et al.*, 2008). Cette enzyme a été détectée chez plusieurs bactéries anaérobies et aérobies (*Sphingomonas* sp., *Stenotrophomonas nitritreducens*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia eutropha*, et *Eubacterium* sp.), et levures (*Trichosporon* sp., *Cryptococcus* sp., *Rhodotorula* sp., *Trichosporon* sp., et *Trichosporon* sp.) (Schatzmayr *et al.*, 2006, Schatzmayr *et al.*, 2002, Schatzmayr *et al.*, 2012). Ainsi, *Streptococcus salivarius*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus delbrueckii*, et certaines bactéries lactiques dégradent jusqu'à 100% d'OTA présente dans le lait (Škrinjar *et al.*, 1996). Durant la fermentation alcoolique, *Saccharomyces cerevisiae* et *Kloeckera apiculata* transforment l'OTA en des métabolites moins toxiques. L'hypothèse de l'adsorption de l'OTA à la paroi de ces levures a été rejetée puisque aucun résidu de cette toxine n'a été trouvé sur leur paroi (Angioni *et al.*, 2007). Cependant, l'absence de l'OT α et de la phénylalanine du milieu réactionnel, suggère l'existence d'une autre voie de dégradation, non présente chez la plupart des microorganismes.

Travail expérimental

Chapitre 1

Etude comparative des effets antifongiques et antiochratoxinogènes des composés phénoliques et huiles essentielles

I. Introduction

Etant la toxine la plus nuisible et la plus répandue dans la famille des ochratoxines, la prévention de la production de l'OTA devint une obligation majeure afin de délivrer aux consommateurs des aliments conformes aux normes exigées. Les stratégies de préventions chimiques et physiques de l'OTA, détaillées dans la partie précédente de ce manuscrit ont pu réduire cette toxine mais en engendrant l'apparition des résidus toxiques dans les aliments traités.

Ce chapitre est dédié à développer des moyens naturelles afin de **prévenir** la production de l'OTA par *A. carbonarius*. D'après l'étude bibliographique approfondie, nous avons trouvé que les huiles essentielles ainsi que les composés phénoliques sont parmi les substances naturelles les plus étudiés dans la lutte contre les champignons filamenteux producteurs de mycotoxines. Ces extraits (huiles essentielles et composés phénoliques) ont montré une capacité intéressante contre la croissance des champignons appartenant au genre *Aspergillus*, notamment *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. niger* et *A. carbonarius*. Ce dernier, étant le majeur producteur de l'OTA sur les raisins dans les pays du bassin méditerranéen, nous étions intéressés d'évaluer l'effet de plusieurs composés phénoliques extraits des plantes médicinales ainsi que celui des huiles essentielles sur la morphologie et la croissance d'*A. carbonarius* S402 (souche isolée du raisin Libanais) ainsi que sa capacité à produire l'OTA sous ces différentes conditions.

Afin de valider cette hypothèse, nous avons procéder à mettre en culture la souche *A. carbonarius* S402 en présence d'un équivalent de 250 µg/mL d'acide gallique de chacun des composés phénoliques extraits des plantes médicinales, ainsi de 1 et 5 µL/mL des huiles essentielles correspondantes.

Les résultats ont montré que les huiles essentielles sont plus efficaces contre la production de l'OTA que les composés phénoliques extraits des mêmes plantes. Ainsi, cette technique nous a permis de classer ces deux types de composés naturels en deux grandes catégories : les antifongiques et les antiochratoxinogènes.

II. Article accepté dans la revue *Antioxidants*



antioxidants



Article

Antifungal and Antiochratoxigenic Activities of Essential Oils and Total Phenolic Extracts: A Comparative Study

Rachelle EL Khoury ^{1,2}, Ali Atoui ³, Florence Mathieu ^{1,*}, Hiba Kawtharani ², Anthony EL Khoury ², Richard G. Maroun ² and Andre EL Khoury ²

¹ Laboratoire de Génie Chimique, Université de Toulouse, Centre National de Recherche Scientifique(CNRS), Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT), Université Paul Sabatier (UPS), Toulouse 31326, France; rachelle.khouryel@net.usj.edu.lb (R.E.K.); hiba.kawtharani@net.usj.edu.lb (H.K.); anthony.khoury4@net.usj.edu.lb (Ant.E.K.); richard.maroun@usj.edu.lb (R.G.M.); andre.khoury@usj.edu.lb (And.E.K.)

² Laboratoire de Mycologie et Sécurité Alimentaire (LMSA), Centre d'analyse et de Recherche (CAR), Campus des Sciences et Technologie, Université Saint-Joseph, Dekwaneh-Beyrouth 1104-2020, Lebanon

³ Laboratory of Microbiology, Department of Natural Sciences and Earth, Faculty of Sciences I, Lebanese University, Hadath Campus, P.O. Box 5 Beirut, Lebanon; a.atoui@cnrs.edu.lb

* Correspondence: Florence.mathieu@ensat.fr; Tel.: +33-534-323-935

Received: 17 May 2017; Accepted: 10 June 2017; Published: date

Abstract: This study is intended to prevent ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus carbonarius* S402 using essential oils (EOs) and total phenolic compounds extracted from plants and herbs. The EOs used in this study are the following: bay leaves, cumin, fenugreek, melissa, mint, and sage. As for the phenolic compounds, they were extracted from bay leaves, cumin, fenugreek, melissa, mint, sage, anise, chamomile, fennel, rosemary, and thyme. The experiments were conducted on Synthetic Grape Medium (SGM) medium at 28 °C for 4 days. OTA was extracted from the medium with methanol and quantified using HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Results showed that EOs had a greater impact than the total phenolic extracts on the OTA production. Reduction levels ranged between 25% (sage) and 80% (melissa) for the EOs at 5 μ L mL⁻¹, and 13% (thyme) and 69% (mint) for the phenolic extracts. Although they did not affect the growth of *A. carbonarius*, total phenolic extracts and EOs were capable of partially reducing OTA production. Reduction levels depended on the nature of the plants and the concentration of the EOs. Reducing OTA with natural extracts could be a solution to prevent OTA production without altering the fungal growth, thus preserving the natural microbial balance.

Keywords: ochratoxin A; essential oils; total phenolic extracts; biocontrol; *Aspergillus carbonarius*

1. Introduction

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced by several species belonging to the *Aspergillus* and *Penicillium* genera. Its presence in common foodstuff and beverages has aroused significant public concern. More particularly, this toxin can be found in numerous food crops, such as cereals and cereal by-products [1], grapes and grape by-products [2], spices [3], and coffee [4]. Moreover, due to the physical stability of OTA, and considering the fact that mycotoxins can be transferred through the food chain, OTA can also be found in tissues and products of animal origins, such as pork and poultry, and dairy products among others [5,6]. The greatest concern about this food contaminant lies within its nephrotoxic, carcinogenic, teratogenic, and

immunotoxic effects on human health following its ingestion [7–9]. Moreover, the International Agency for Research on Cancer has enlisted the OTA in the group 2B as a possible human carcinogen [10]. The European Union (EU), as well as many other countries, has set maximum permitted levels of this toxin on a variety of food and feed to limit the risk of human exposure [11].

OTA production and fungal growth are associated with environmental and nutritional factors such as pH, temperature, water activity, and nitrogen and carbon sources [12]. Nevertheless, little is known about the oxidative stress and antioxidants' effects on the OTA production as well as the fungal growth of *A. carbonarius*. The correlation between the oxidative stress as well as the reactive oxygen species and mycotoxin production was firstly evaluated in 2000 by Jayashree Subramanyam [13] who found that the increasing oxidative stress induced the aflatoxins production, leading to enhanced lipid peroxydation and the generation of reactive oxygen species. While the oxidative stress induces mycotoxin production, the presence of antioxidant molecules in the culture media reduces the production of such mycotoxins (aflatoxins, fumonisins) [14–16]. These antioxidants can be found in plants extracts such as the essential oils (EOs) and phenolic compounds that have proven their efficiency against mycotoxin production. As for the OTA, numerous studies were conducted on the capacity of EOs to reduce fungal growth as well as the production of this particular toxin. In our previous work, we studied the effect of several EOs, such as fennel, rosemary, celery, chamomile, oregano, cinnamon, and thyme on the growth of *A. carbonarius* and OTA production. In fact, the EOs of thyme, cinnamon, and oregano were found to be effective against *A. carbonarius* [17]. On the other hand, the EOs of the fennel, chamomile, and celery were only effective against OTA production by *A. carbonarius*, suggesting a different mode of action of the studied EOs.

Nevertheless, the effect of naturally extracted total phenolic compounds on the growth of *A. carbonarius* and its OTA production has not been yet evaluated. Therefore, the aim of this study was to focus on reducing the production of OTA and establishing a comparative study between total phenolic extracts extracted from the anise, bay leaves, chamomile, cumin, fennel, fenugreek, melissa, mint, rosemary, sage, and thyme as well as their corresponding EOs. The activity of five of these EOs (anise, chamomile, fennel, rosemary, and thyme) was tested in our previous work.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

In this study, the phenolic compounds were extracted from 11 plants that we purchased from a Lebanese market. The plants were the following: anise, bay leaves, chamomile, cumin, fennel, fenugreek, melissa (lemon balm), mint, rosemary, sage, and thyme.

The EOs were also purchased from a Lebanese market: mint, cumin, melissa, bay leaves, fenugreek, and sage.

2.2. Extraction of Phenolic Compounds from Medicinal Plants

The extraction of the phenolic compounds commenced by grinding all the 11 dried plants with a mixer until they were transformed into a fine powder. Then, 10 g of each plant powder were mixed with 100 mL acetone (85:15 v/v) and incubated for 24 h at 37 °C in a shaker/incubator (Model SI-45, serial number AS-SI45-1038E). After the maceration, the mix was then filtered through 150 mm filters (grade 290, particles retention size 80 g/m², Sartorius filter discs, AG-37070, Goettingen, Germany). In order to have a filtrate free from microorganisms and fungal spores, we proceeded to perform a second filtration with 0.22 µm filters (Ministart Syringe Filter, Sartorius Stedium Biotech GmbH-37070, Goettingen, Germany). Finally, the mixture was incubated at 45 °C for 24 h to evaporate the acetone and obtain a sterile powder that was later blended with 4 mL of sterilized water. Vortexing the mixture was a necessary step to ensure its homogeneity. As for the EOs, they were bought from a Lebanese market with no further modifications.

2.3. Quantification of the Extracted Phenolic Compounds

In order to estimate the total phenolic contents in the previously prepared mixture, a series of gallic acid dilution is required (for the standard curve), and the results were calculated and expressed as μg GAE (Gallic Acid Equivalents). The amount of total phenolics was determined using the

Folin–Ciocalteu method. In this method, 5 mL of distilled water were added to a 10 mL volumetric flask. A suitable volume of each plant extract was added to the flask along with 0.2 mL of the Folin–Ciocalteu reagent and mixed well. After 3 min of incubation in the dark, 0.4 mL of saturated Na_2CO_3 solution was added to the mixture, and the volume was completed with distilled water. After 1 h in the dark, the absorbance was measured with a spectrophotometer (Biotech engineering Management Co. LTD. UK, UV-9200) set at 725 nm.

2.4. Strains and Culture Conditions

The *A. carbonarius* S402 strain used in this study was isolated from Lebanese grapes by El Khoury et al. [18]. The *A. carbonarius* strain S402 was sub-cultured on Czapec-Yeast-Agar medium (CYA) for 4 days at 28 °C. The CYA medium was prepared as described by El Khoury, Rizk, Lteif, Azouri, Delia, and Lebrihi [18]. After the incubation period, a spores suspension was prepared by adding 8 mL of a sterile Tween 80 (0.05%) to the surface of the culture, followed by a gentle scrapping with a sterile Pasteur Pipette (Chase Scientific Glass, Inc., Rockwood, TN, USA). The evaluation of the spores' concentration was conducted with a Neubauer haemocytometer (Superior, Marienfield, Lauda-Königshofen, Germany) that helped adjust the concentration to 10^6 spores mL^{-1} . The spores' suspension was then held at 4 °C for further use.

The effect of the extracted phenolic compounds as well as the EOs on the OTA production was evaluated on SGM medium (Synthetic Grape Medium) prepared following the instructions described by Bejaoui et al. [19].

For the phenolic compounds, an equivalent of 250 μg GAE mL^{-1} of each extract was added to 20 mL of SGM medium, followed by the addition of 1 mL of the previously prepared spore solution in the center of the Petri dishes. As for the EOs, we followed the same procedure described in our previous work [17]. In order to compare and evaluate the effect of the total phenolic compounds as well as the EO on OTA production, a control culture was prepared without adding either of the phenolic extracts or the EOs to the medium.

All assays were carried out in triplicates for each condition.

2.5. Growth, Fungal Weight Analysis, and Morphological Alteration of *A. Carbonarius* S402

The evaluation of *A. carbonarius* dry weight (g) as well as its radial growth (cm) were conducted by placing a sterilized transparent cellophane film on the surface of the SGM medium previously mixed with either phenolic compounds or EOs. This step was followed by the addition of 10^6 spores mL^{-1} of the *A. carbonarius* spore solution in the center of the cellophane film. After 4 days of culture at 28 °C, *A. carbonarius* dry weight was evaluated by weighing the mycelium after its desiccation at 90 °C for 24 h. The radial growth was assessed by measuring the cultures' diameters after the incubation period.

All assays were carried out in triplicates for each condition.

The morphological effects of the six EOs and 11 phenolic extracts on *A. carbonarius* were evaluated macroscopically. We evaluated their impact on the color of the fungus (sporulation), thickness, and mycelium production.

2.6. OTA Extraction and HPLC (High Proficiency Liquid Chromatography) Analysis

The OTA was extracted from the SGM medium by removing three agar plugs (0.5 cm diameter) from each culture condition as well as the control. After placing them in 3 mL microtubes, a volume of 1 mL of HPLC grade methanol was added to the plugs. The mix was then incubated and shaken for one hour at room temperature. After centrifugation at 12,054 g, the phase containing the OTA was separated from the debris and diluted with 20 mL phosphate buffer in order to prepare the extract to be purified with immunoaffinity

columns. The purification process starts by injecting the diluted OTA into Ochraprep immunoaffinity columns (R-Biopharm, Glasgow, Scotland) using a syringe. The elution of the OTA was performed by adding 1.5 mL of methanol/acetic acid (98:2, v/v) followed by 1.5 mL of distilled water. After filtering with 0.4 µm filters (Satorius stedim, Biotech, Goettingen, Germany), the OTA extract was then evaluated using a Water Alliance HPLC system equipped with an Utisphere ODB column, C18 (150 × 4.6 mm, 5 µm, 120 Å) (Interchim, Montluçon, France) at 30 °C. A 30 min isocratic flow was delivered at 49% of acidified water/acetic acid (99.8:0.2, v/v) (eluent A) and 51% of acetonitrile (eluent B). The flow rate was set at 1 mL min⁻¹ and the volume of the injected extract at 100 µL. The OTA was detected by a fluorescent detector set at 333/440 nm (excitation/emission wavelengths). OTA concentrations were calculated based on a standard calibration curve.

2.7. Statistical Analysis

All the data in this study were analyzed through one-way analysis of variance (ANOVA) and paired t-test using STATGRAPHICS Centurion XVI (version 16.1.11 for Windows, 2010, StatPoint Technologies Inc. Warrenton, VA, USA).

3. Results

3.1. Phenolic Content of the Extracts

Extracts from the studied plants and leaves were quantified for their contents of phenolic compounds and expressed as GAE g⁻¹ of dried plant (Gallic Acid Equivalent). The fenugreek contained the highest content of phenolics (95.21 µg GAE g⁻¹ ± 1.12). The lowest phenolic contents were found in the extracts of the anise (9.05 µg GAE g⁻¹ ± 0.28) and the cumin (9.62 µg GAE g⁻¹ ± 3.26) as shown in Figure 1.

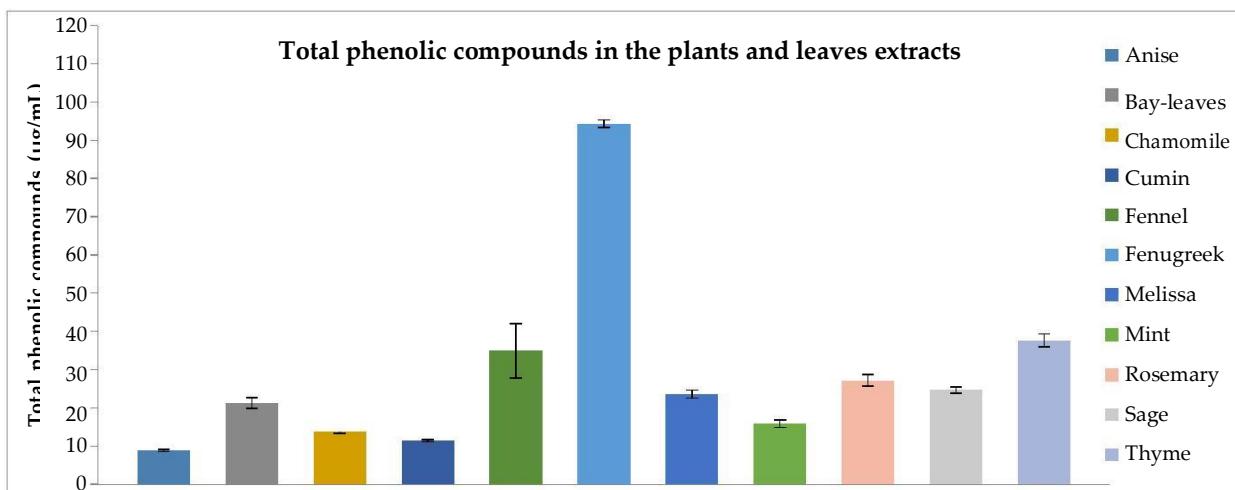


Figure 1. Total phenolic content of the plant and leaves extracts determined by the Folin-Ciocalteu assay and calculated as GAE in µg g⁻¹ extract based on dry weight. Results are the average of triplicates ± SD (Standard Deviation). Abbreviations: GAE: Gallic acid Equivalent.

3.2. Comparison between Six Essential Oils and Phenolic Extracts on the Radial Growth of *A. carbonarius* S402

The effects of the extracted phenolic compounds and the EOs on the radial growth of *A. carbonarius* are summarized in Table 1.

Table 1. Radial growth (cm) of *Aspergillus carbonarius* S402 after four days of culture at 28°C on Synthetic Grape Medium (SGM) supplemented with the phenolic extracts at 250 µg GAE mL⁻¹ as well as essential oils (EOs) at 1 and 5 µL mL⁻¹ each, compared to a control.

| Plant Material | Radial Growth (cm) | | |
|----------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | Phenolic extracts | EOs at 1 µL mL ⁻¹ | EOs at 5 µL mL ⁻¹ |
| Control | 5.90 ± 0.43 ^a | 5.90 ± 0.43 ^a | 5.90 ± 0.43 ^a |
| Bayleaves | 8.00 ± 0.34 ^{*,d} | 7.46 ± 0.30 ^{*,b} | 7.26 ± 0.15 ^{*,b} |
| Cumin | 8.43 ± 0.47 ^{*,e} | 7.13 ± 0.05 ^{*,c} | 6.43 ± 0.35 ^{*,c} |
| Fenugreek | 7.70 ± 1.04 ^{*,c} | 7.20 ± 0.20 ^{*,c} | 6.60 ± 0.10 ^{*,c} |
| Melissa (Lemon balm) | 7.20 ± 0.10 ^{*,b} | 7.93 ± 0.15 ^{*,d} | 6.20 ± 0.20 ^{*,d} |
| Mint | 7.56 ± 0.20 ^{*,c} | 4.23 ± 0.05 ^{*,e} | 4.80 ± 0.10 ^{*,e} |
| Sage | 8.06 ± 0.15 ^{*,d} | 3.30 ± 0.10 ^{*,f} | 2.90 ± 0.10 ^{*,f} |

The means of the radial growth (cm) ± the standard deviation of the triplicates are represented in this table. Statistical differences are indicated as: * = significant difference ($p < 0.05$). Data with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$). Abbreviations: GAE: Gallic acid Equivalent, EO: Essential oils.

Our results showed that these extracts affected the radial growth, depending on the nature of the extract (Table 1). Notably, the six phenolic extracts (bay leaves, cumin, fenugreek, melissa, mint, and sage) stimulated the radial growth almost in the same manner (26.25%, 30.01%, 23.3%, 18.05%, 21.9%, and 26.7%, respectively). As for the EO, at 1 µL mL⁻¹, the bay leaves, cumin, fenugreek, and melissa also enhanced the radial growth by 20.9%, 17.25%, 18.05%, and 25.59%, respectively. At 5 µL mL⁻¹, these increments were lower, and reached 18.73%, 8.24%, 10.06%, and 4.8% for the aforementioned EO, respectively. The mint and sage EO had an opposite effect on the radial growth, as they reduced it by 28.30% and 18.06% for the mint EO at 1 and 5 µL mL⁻¹, respectively, and 44.06% and 50.84% for the sage EO at 1 and 5 µL mL⁻¹ respectively.

3.3. Morphologic Changes in *A. Carbonarius* Cultured with EO and Phenolic Compounds

Adding EO or phenolic extracts to the SGM medium resulted in a change of the macroscopic morphology of all *A. carbonarius* S402 cultures (compared to the control represented in Figure 2A). Surprisingly, the extracts and EO that enhanced the radial growth of the fungus reduced its capacity of sporulation. For example, melissa, cumin, fenugreek, sage, and mint phenolic extracts did increase the radial growth, nevertheless, the cultures seemed airy, light, and the white mycelium was dominant over the typical black spores of *A. carbonarius* (Figure 2B). The bay leaves extracts, on the other hand, increased the sporulation of *A. carbonarius*, as shown in Figure 2C. These morphological aspects were similar for the EO: even though some EO did not significantly affect the fungal radial growth they had a great impact on the sporulation. For example, the radial growth of *A. carbonarius* cultured with mint EO at 1 µL mL⁻¹ (Figure 2D) did not change significantly, but the culture was thick, dense, and dominated by the white mycelium.

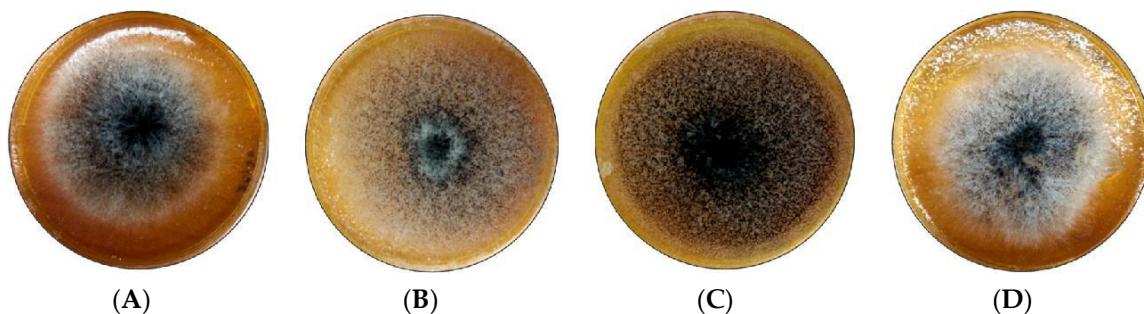


Figure 2. Morphological aspects of *A. carbonarius* S402 in Synthetic Grape Medium (SGM), at 28 °C for 4 days. (A): Control, (B) Cumin phenolic extracts, (C) Bay leaves phenolic extracts, and (D): mint EO at 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$

3.4. Comparison between Phenolic Extracts and Essential Oils on Dry Weight and OTA Production

When added to SGM medium, the six EOs, showed a great impact against OTA produced by *A. carbonarius*, without having a pronounced effect on the fungal weight for most of the EOs. Figure 3 and Figure 4 illustrate the differences between total phenolic extracts and EOs on the fungal dry weight and OTA production.

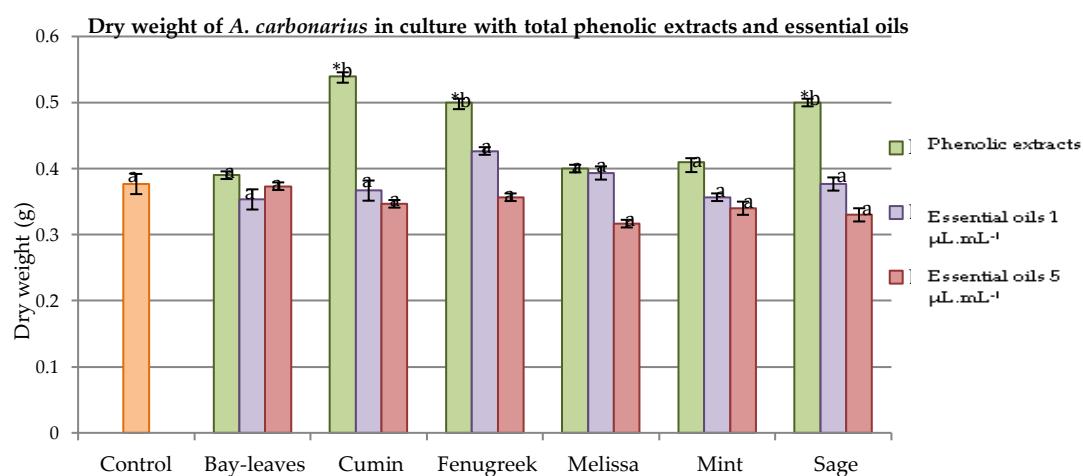


Figure 3. Graphical comparison between phenolic extracts and essential oils at 1 and 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ on the dry weight of *Aspergillus carbonarius* S402 cultured in a synthetic grape medium at 28 °C for 4 days. Statistical differences are indicated as: * = significant difference ($p < 0.05$). Data with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$).

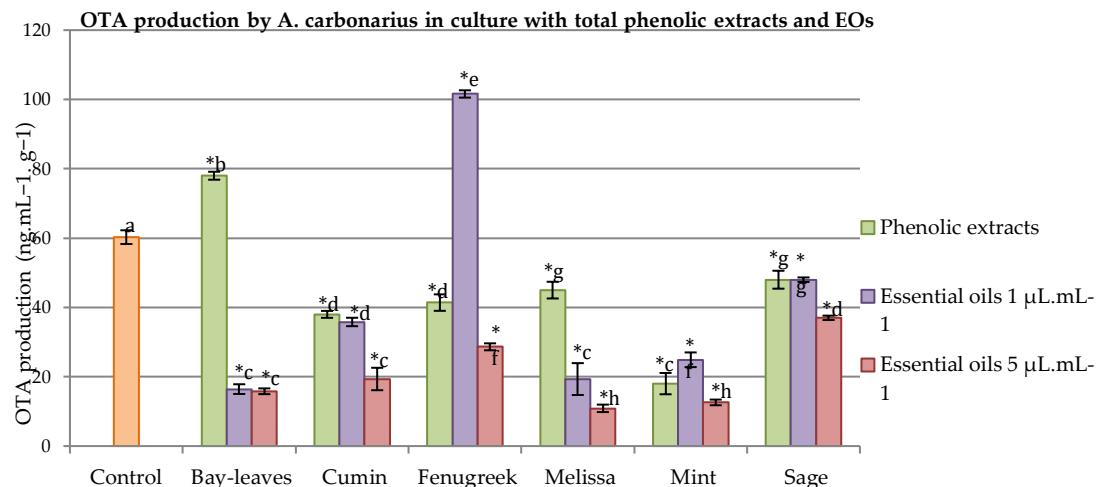


Figure 4. Graphical comparison between the effects of phenolic extracts and essential oils at 1 and 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ on the ochratoxin A (OTA) produced by *A. carbonarius* S402 cultured in a synthetic grape medium at 28 °C for 4 days. Statistical differences are indicated as: * = significant difference ($p < 0.05$). Data with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$).

Results showed that neither the EOs nor phenolic extracts were able to completely block the growth of *A. carbonarius* S402. In fact, none of the six EOs (bay leaves, cumin, fenugreek, mint, melissa, and sage) significantly affected the dry weight of the studied fungus. On the other hand, the cumin, fenugreek, and sage phenolic extracts increased the fungal weight instead of reducing it, by 30.3% for the cumin and 22% equally for the fenugreek and sage. These weight increments were in correlation with the sporulation of *A. carbonarius* that was also increased by these extracts, whereas the phenolic extracts of the bay leaves, melissa, and mint did not significantly reduce the fungal weight of *A. carbonarius*.

Concerning the OTA production, both phenolic extracts and EOs acted differently when added to *A. carbonarius* cultures. For example, some EOs at 1 and 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ severely affected the OTA, while the phenolic extracts had a mild impact on the production of that toxin. More particularly, cumin EO at 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ as well as its phenolic extract reduced equally the OTA by 37.3%, while at 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ the OTA levels reached a reduction of 69.5%. The melissa phenolic extracts reduced the OTA by 32.3%, by 78% with the EO at 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$, and 80% with the corresponding EO at 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

The fenugreek and bay leaves showed irregularity in this topic. In fact, adding 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ of fenugreek EO to the SGM medium enhanced OTA production by 45.1% while at 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ this toxin production was reduced by 60%, while the total phenolic extracts of these seeds reduced it by 32%. As for the bay leaves, their EO at 1 and 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ equally decreased the OTA by 72%, unlike their phenolic extracts, which increased the level of this mycotoxin by 24.5%.

Surprisingly, an even reduction of OTA reaching 25% was observed when the sage phenolic extract and EO (at both concentrations) were added to the culture medium. The mint phenolic extracts and EOs acted almost in the same manner, reducing OTA levels by 69% (phenolic extracts), 60% and 70% for the EO at 1 and 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectively.

As for the results of the five remaining phenolic extracts (anise, chamomile, fennel, rosemary, and thyme), their effects on radial growth, dry weight, and OTA production are represented in Table 2.

Table 2. Radial growth (cm), dry weight of *Aspergillus carbonarius* S402, and OTA production (ng $\text{mL}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ of dry weight) after four days of culture at 28 °C on Synthetic Grape Medium (SGM) supplemented with the five phenolic extracts at 250 µg GAE mL^{-1} .

| Plant Material | Radial Growth (cm) | Dry Weight (g) | OTA Production (ng $\text{mL}^{-1} \text{g}^{-1}$ of Dry Weight) |
|----------------|----------------------------|-----------------------------|--|
| Control | 5.90 ± 0.43 ^a | 0.385 ± 0.01 ^a | 60.37 ± 0.46 ^a |
| Fennel | 6.33 ± 0.20 ^{*,b} | 0.486 ± 0.02 ^a | 60.25 ± 0.08 ^a |
| Rosemary | 5.63 ± 0.20 ^a | 0.240 ± 0.01 ^{*,c} | 51.92 ± 1.46 ^{*,d} |
| Chamomile | 8.16 ± 0.15 ^{*,c} | 0.510 ± 0.13 ^{*,b} | 40.95 ± 2.55 ^{*,b} |
| Anise | 5.60 ± 0.30 ^a | 0.435 ± 0.05 ^a | 36.62 ± 0.54 ^{*,b} |
| Thyme | 7.93 ± 0.05 ^{*,d} | 0.433 ± 0.01 ^a | 31.64 ± 1.53 ^{*,c} |

The means of the radial growth (cm), the dry weight (g), and OTA production (ng $\text{mL}^{-1} \text{g}^{-1}$ of dry weight) ± the standard deviation of the triplicates are represented in this table. Statistical differences are indicated as: * = significant difference ($p < 0.05$). Data with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$). Abbreviations: OTA: ochratoxin A, GAE: Gallic acid Equivalent.

Results showed that three of the five extracts (chamomile, fennel, and thyme) significantly enhanced the radial growth of the fungus by 27.69%, 6.7%, and 11.08%, respectively, while the other two (anise and rosemary) had no significant effect on the fungal growth. As for the dry weight, anise, fennel, and thyme did not have an impact on the growth of *A. carbonarius*, chamomile increased it by 24.5%, and rosemary reduced it by 37.6%. Regarding the OTA production, the presence of the phenolic extracts reduced the production of OTA at different levels: 47.5%, 39.3%, 32.1%, and 13.9% for the thyme, anise, chamomile, and rosemary, respectively, and no change in the OTA production was observed when the fennel extracts were added to the SGM medium.

4. Discussion

Medicinal plants, herbs, spices, and edible and non-edible plants were always the center of attention when it came to mycotoxin reduction and/or prevention of fungal growth. Their EOs and phenolic compounds were proven to be effective against several fungal species. In this study, EOs exhibited the best antifungal and antiochratoxigenic effect in comparison to those of ethanolic phenolic extracts. In fact, none of the phenolic extracts were able to significantly reduce *A. carbonarius* dry weight, whereas only the sage at 5 µL mL^{-1} decreased it by 10.8%. Nevertheless, phenolic extracts as well as EOs exhibited strong effects on OTA reduction. For instance, the mint was the most effective among the 11 tested phenolic extracts. It reduced OTA production by up to 70% without affecting the fungal dry weight. These results are similar to those obtained by Panda et al. [20] who found that the phenolic extracts from *Mentha arvensis*, commonly known as mint leaves, highly reduced the citrinin production by *P. citrinum* without truly affecting its growth. The use of the mint EO at 0.5 µL mL^{-1} allowed the growth of *A. ochraceus* with no detectable OTA in the culture medium [21]. In a study by Hitokoto et al. [22], the use of thyme caused a 10% to 90% growth reduction in *A. flavus*, *A. versicolor*, and *A. ochraceus* but showed complete and nonlinear inhibition of their toxin production (86% to 100%). In their study, basil leaves and cumin also partially reduced *A. ochraceus* growth but blocked its OTA production. These results are similar to ours, where these extracts acted in the same manner: the phenolic extracts of the basil leaves and the cumin as well as their EOs did not act in a proportionate way regarding fungal weight reduction and the OTA production. In fact, the phenolic extracts of the bay leaves had no significant effect on *A. carbonarius* growth but reduced OTA by 26.5%.

As for the phenolic extracts of the anise, chamomile, fennel, rosemary, and thyme, their effects on OTA production were lower than those found with the EOs in our previous study [17]. In fact, the thyme phenolic extracts reduced OTA production by 47.5% but had no effect on the growth of *A.*

carbonarius. The EO of the thyme acted differently: at 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ it completely blocked the fungal growth, and at 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ it reduced OTA by up to 90% (this reduction was in correlation with growth reduction). As for the anise, chamomile, and rosemary, their capacity on reducing OTA production was lower than their corresponding EOs: anise phenolic extracts only reduced OTA by 35.25% although its EO reduced it by 76.6% and 83.9% (at 1 and 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectively). Chamomile phenolic extracts reduced it by 32.16%, its EO at 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ by 67.5%, and at 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ by 78.1%. The same reduction profile was obtained with the phenolic extracts and EOs of the rosemary: the OTA was reduced by 14.01% with the phenolic extracts, 53.7% and 78.3% with rosemary EO when used at 1 and 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectively. Surprisingly, the fennel phenolics did not reduce OTA although its EO at 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ reduced it by 88.9% (the highest reduction obtained in our previous study). These differences may be attributed to the role of the active ingredients of the EOs that are implicated in the repression of the OTA biosynthetic genes expression of *A. carbonarius* (reductions reached 99.2% for the *acpk*s gene responsible for the early steps of OTA biosynthesis).

Despite the rarity of studies on the antifungal and antimycotoxic effects of total phenolic extract, the active components found in these extracts were thoroughly studied. In general, eugenol (basil), vanillic acid (sage), caffeic acid (mint), rosmarinic acid (mint), *p*-coumaric acid (cumin), and cinnamic derivatives (bay leaves) are the main active component responsible for the antioxidant activity of the phenolic extracts [23–27]. The caffeic, cinnamic, ferulic and vanillic acids were proven to control aflatoxigenic fungi and AFB1 production as well as fumonisin on maize during storage [28,29]. Likewise, Palumbo et al. [30] found that OTA can be reduced by the use of different phenolic antioxidant such as 4-hydroxybezoic acid on *A. carbonarius*, *A. sulphureus*, *A. alliaceus*, and *A. lanosus*, vanillic acid on *A. albertensis* and *A. elegans*, as well as catechin on *A. sulphureus*.

Some authors reported that the antioxidant activity of different plant extracts depends on their phenolic content, while others found no such correlation, because of the presence of other active ingredients in each plant [31–33]. Moreover, da Cruz Cabral, et al. [34] stated that the potential of plant extracts to decrease fungal growth and/or mycotoxin production depends on their composition and the nature of the solvent used for the extraction. In fact, the solvents with a polar nature have a better penetration capacity than none polar ones, enabling them to extract a wider variety of compounds from the plant tissues. The acetone that we used in this study, as well as the methanol was found to be the best solvents for the extraction of antifungal compounds [35,36]. Furthermore, the type of the phenolic structure was proven to be more important than the concentration: molecules with a hydroxyl group having a system of delocalized electrons in the phenolic structure have the highest antioxidant activity [37]. To date, the mechanisms of action of active compounds in plant extracts are not completely understood. Nevertheless, numerous authors support the idea of the existence of three aspects for their inhibitory functions: first, the enzymes responsible for intracellular functions can be altered by the presence of -OH groups, and are able to form hydrogen bonds with those enzymes. Secondly, the rigidity and integrity of the hypha cell wall can be lost due to the interaction of these compounds with the membrane enzymes of the fungi. Lastly, the rupture of the cytoplasmic membrane can be achieved by the change of permeability of the cell membranes and granulation of the cytoplasm. In addition, the hydrophobicity of certain compounds found in the EOs extracts allows them to cross the cell membrane and change their permeability for cations such as H^+ and K^+ , thus changing the flow of protons and the pH of the cells, affecting their chemical compositions and activities [34]. Phenolic compounds are also capable of altering the fungal cell permeability, resulting in the loss of macromolecules from the cell interior and interacting with the proteins of the membrane, leading to their structure and functionality deformation [38].

As for the phenolic extracts and EOs that enhanced OTA production, such as bay leaves extracts and fenugreek EO at 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$, Prakash et al. [39] reported that the use of low concentrations of *Piper betle L.* EO on *A. flavus* cultures increased AFB1 production, implicating that low fungicide doses create some stress condition which was responsible for the production of more secondary metabolites as a defense mechanism by the fungus. The same observation was noted by Wu et al. [40] who found that *F. oxysporum* biomass was reduced with ferulic acid that increased its mycotoxin production by 227.7%.

The different macroscopic aspects of *A. carbonarius* S402 between the control and the treated samples were highly noticed in this study. In fact, the extracts enhanced radial growth, and reduced the sporulation of the fungus, resulting in OTA reduction. For example, adding 250 $\mu\text{L mL}^{-1}$ of cumin phenolic extracts to SGM medium caused a radial growth increment (47.8%), OTA reduction (37.3%), and the cultures were dominated by the presence of white mycelium. These transformations were observed by Ferreira et al. [41] who found that the use of curcumin EO at 1% on *A. flavus* cultures did not only reduce sporulation by 95.78%, but also decreased the viability of the remaining spores to 100%. *A. parasiticus* manifested the same results when it was cultured with thyme's EO. In fact, after 5 days of culture, its sporulation capacity was reduced by 95% [42].

5. Conclusion

The natural chemical structure of phenolic compounds and essential oils provides them with the potential of being acceptable antifungal and antimycotoxic agents for application on food matrices. This study demonstrated that EOs could strongly reduce OTA rather than reducing the growth of *A. carbonarius*. They are more efficient than the phenolic compounds extracted from the same plants, reaching 70% and 80% for the EOs of the melissa and mint, respectively. As for the total phenolic extracts such as mint, anise, and thyme, they were capable of only partially reducing OTA production (69%, 35.25%, and 47.5%, respectively). This study is a first step toward reducing the occurrence of OTA and its daily ingestion by humans. Nevertheless, in order for it to succeed, a deeper more detailed study should be conducted on the efficiency of these natural compounds on other ochratoxigenic and mycotoxic species.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Research Council of Saint-Joseph University (Lebanon), and the Polytechnic National Institute of Toulouse (INPT), as well as the French Institute–Campus France and the National Council for Scientific Research, Lebanon (CNRS-L) for the financial support of Rachelle El Khoury.

Author Contributions: Florence Mathieu, Ali Atoui, Andre El Khoury, and Richard G. Maroun conceived, supervised, and designed the experiments. Rachelle El Khoury performed the experiments. Rachelle El Khoury, Ali Atoui, Andre El Khoury, and Florence Mathieu wrote the paper. Ali Atoui contributed to qRT-PCR performance and data analysis. Hiba Kawtharani and Anthony El Khoury helped with the experiments.

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

References

1. Park, J.W.; Chung, S.H.; Kim, Y.B. Ochratoxin a in korean food commodities: Occurrence and safety evaluation. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4637–4642.
2. Pietri, A.; Bertuzzi, T.; Pallaroni, L.; Piva, G., IV. Occurrence of ochratoxin A in italian wines. *Food addit. Contam.* **2001**, *18*, 647–654.
3. Overy, D.P.; Seifert, K.A.; Savard, M.E.; Frisvad, J.C. Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *88*, 69–77.
4. Juodeikiene, G.; Bartkienė, E.; Basinskienė, L.; Matusevičius, P. Mycotoxin decontamination aspects in food, feed and renewables using fermentation processes. In *Structure and Function of Food Engineering*; In Tech Open Access Publisher: Rijeka, Croatia, 2012.
5. Piskorska-Pliszczynska, J.; Juszakiewicz, T. Tissue deposition and passage into eggs of ochratoxin A in Japanese quail. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **1989**, *10*, 8–10.
6. Publication, E.; Larsen, J.C. *Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a Request from the Commission Related to Ochratoxin A (OTA) as Undesirable Substance in Animal Feed*; European Food Safety Authority: Parma, Italy, 2004.
7. Mally, A.; Keim-Heusler, H.; Amberg, A.; Kurz, M.; Zepnik, H.; Mantle, P.; Völkel, W.; Hard, G.C.; Dekant, W. Biotransformation and nephrotoxicity of ochratoxin B in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *206*, 43–53.
8. Stoev, S.D.; Denev, S.; Dutton, M.F.; Njobeh, P.B.; Mosonik, J.S.; Steenkamp, P.A.; Petkov, I. Complex etiology and pathology of mycotoxic nephropathy in south african pigs. *Mycotoxin Res.* **2010**, *26*, 31–46.

9. Maruya, K.; Reddy, V.; Hayes, A.W.; Berndt, W.O. Embryocidal, fetotoxic and teratogenic effects of ochratoxin A in rats. *Toxicology* **1982**, *25*, 175–185.
10. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Hum.* **1993**, *56*, 489–521.
11. Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, World Health Organization. *Codex Alimentarius: Food Hygiene, Basic Texts*; Food & Agriculture Org.: Rome, Italy, 2003.
12. Khalesi, M.; Khatib, N. The effects of different ecophysiological factors on ochratoxin A production. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2011**, *32*, 113–121.
13. Jayashree, T.; Subramanyam, C. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *29*, 981–985.
14. Boutigny, A.L.; Barreau, C.; Atanasova-Penichon, V.; Verdal-Bonnin, M.N.; Pinson-Gadais, L.; Richard-Forget, F. Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycol. Res.* **2009**, *113*, 746–753.
15. Kim, J.H.; Yu, J.; Mahoney, N.; Chan, K.L.; Molyneux, R.J.; Varga, J.; Bhatnagar, D.; Cleveland, T.E.; Nierman, W.C.; Campbell, B.C. Elucidation of the functional genomics of antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *122*, 49–60.
16. Passone, M.; Resnik, S.; Etcheverry, M. In vitro effect of phenolic antioxidants on germination, growth and aflatoxin b1 accumulation by peanut aspergillus section flavi. *J. Appl. Microbiol.* **2005**, *99*, 682–691.
17. El Khoury, R.; Atoui, A.; Verheecke, C.; Maroun, R.; El Khoury, A.; Mathieu, F. Essential oils modulate gene expression and ochratoxin A production in aspergillus carbonarius. *Toxins* **2016**, *8*, 242.
18. El Khoury, A.; Rizk, T.; Lteif, R.; Azouri, H.; Delia, M.-L.; Lebrihi, A. Occurrence of ochratoxin A-and aflatoxin B1-producing fungi in lebanese grapes and ochratoxin A content in musts and finished wines during 2004. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8977–8982.
19. Bejaoui, H.; Mathieu, F.; Taillandier, P.; Lebrihi, A. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *97*, 1038–1044.
20. Panda, P.; Aiko, V.; Mehta, A. Effect of aqueous extracts of *Mentha arvensis* (mint) and *Piper betle* (betel) on growth and citrinin production from toxigenic *Penicillium citrinum*. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 3466–3474.
21. Basílico, M.Z.; Basílico, J.C. Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. *Lett. Appl. Microbiol.* **1999**, *29*, 238–241.
22. Hitokoto, H.; Morozumi, S.; Wauke, T.; Sakai, S.; Kurata, H. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **1980**, *39*, 818–822.
23. Oktay, M.; Gülcin, İ.; Küfrevoğlu, Ö.İ. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT-Food Sci. Technol.* **2003**, *36*, 263–271.
24. Lee, S.-J.; Umano, K.; Shibamoto, T.; Lee, K.-G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem.* **2005**, *91*, 131–137.
25. Zheng, W.; Wang, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5165–5170.
26. Shan, B.; Cai, Y.Z.; Sun, M.; Corke, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7749–7759.
27. Zohra, S.F.; Meriem, B.; Samira, S.; Alsayadi-Muneer, M. Phytochemical screening and identification of some compounds from mallow. *J. Nat. Prod. Plant Resour.* **2012**, *2*, 512–516.
28. Nesci, A.; Gsponer, N.; Etcheverry, M. Natural maize phenolic acids for control of aflatoxigenic fungi on maize. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, M180–M185.
29. Samapundo, S.; De Meulenaer, B.; Osei-Nimoh, D.; Lamboni, Y.; Debevere, J.; Devlieghere, F. Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage? *Food Microbiol.* **2007**, *24*, 465–473.
30. Palumbo, J.D.; O'Keeffe, T.L.; Mahoney, N.E. Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. *Mycopathologia* **2007**, *164*, 241–248.
31. Yang, J.-H.; Lin, H.-C.; Mau, J.-L. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food chem.* **2002**, *77*, 229–235.

32. Maillard, M.-N.; Berset, C. Evolution of antioxidant activity during kilning: Role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1789–1793.
33. Heinonen, I.M.; Lehtonen, P.J.; Hopia, A.I. Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 25–31.
34. Da Cruz Cabral, L.; Fernandez Pinto, V.; Patriarca, A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *166*, 1–14.
35. Cakir, A.; Kordali, S.; Kilic, H.; Kaya, E. Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. *Biochem. Syst. Ecol.* **2005**, *33*, 245–256.
36. Mahlo, S.M.; McGaw, L.J.; Eloff, J.N. Antifungal activity of leaf extracts from south african trees against plant pathogens. *Crop Prot.* **2010**, *29*, 1529–1533.
37. Oliveira, M.d.S.; Furlong, E.B. Screening of antifungal and antimycotoxicogenic activity of plant phenolic extracts. *World Mycotoxin J.* **2008**, *1*, 139–146.
38. Fung, D.Y.C.; Taylor, S.U.E.; Kahan, J. Effects of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus*. *J. Food Saf.* **1977**, *1*, 39–51.
39. Prakash, B.; Shukla, R.; Singh, P.; Kumar, A.; Mishra, P.K.; Dubey, N.K. Efficacy of chemically characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *142*, 114–119.
40. Wu, H.-S.; Luo, J.; Raza, W.; Liu, Y.-X.; Gu, M.; Chen, G.; Hu, X.-F.; Wang, J.-H.; Mao, Z.-S.; Shen, Q.-R. Effect of exogenously added ferulic acid on in vitro *Fusarium oxysporum* f. Sp. *niveum*. *Sci. Hortic.* **2010**, *124*, 448–453.
41. Ferreira, F.D.; Mossini, S.A.G.; Ferreira, F.M.D.; Arroteia, C.C.; da Costa, C.L.; Nakamura, C.V.; Junior, M.M. The inhibitory effects of *Curcuma longa* L. essential oil and curcumin on *Aspergillus flavus* link growth and morphology. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 6.
42. Silva, F.C.D.; Chalfoun, S.M.; Siqueira, V.M.D.; Botelho, D.M.D.S.; Lima, N.; Batista, L.R. Evaluation of antifungal activity of essential oils against potentially mycotoxicogenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2012**, *22*, 1002–1010.



© 2017 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

III. Conclusion

La comparaison entre les effets des huiles essentielles et des composés phénoliques nous a permis de conclure que l'emploi de certains de ces composés n'a pas gravement affecté la masse sèche d'*A. carbonarius* S402, cependant leur effet sur la production de l'OTA était remarquable.

Effectivement, les huiles essentielles des feuilles de laurier, de la menthe et de la mélisse ont réduit considérablement l'OTA de 72, 70 et 80% respectivement pour chaque huile.

L'utilisation des composés phénoliques a été efficace contre la production de l'OTA mais d'une ampleur moindre à celle des huiles essentielles, à l'exception du fenugrec qui, son huile essentielle (à 1 µL/mL) a augmenté d'avantage la production de l'OTA (45.1%) pourtant ses composés phénoliques l'ont inhibé (32.0%).

Afin de mieux comprendre le mode d'action des huiles essentielles qui n'ont pas affecté la croissance fongique mais qui ont inhibé remarquablement la production de l'OTA, nous nous sommes focalisés dans la suite de notre travail à l'évaluation de l'impact de ses huiles sur l'expression des gènes de biosynthèse de l'OTA chez *A. carbonarius* S402.

Chapitre 2

**Huiles essentielles : agents
antiochratoxinogènes, antifongiques
et réprimeurs des gènes de
biosynthèse chez *Aspergillus
carbonarius***

I. Introduction

Obtenues par hydrodistillation du matériel végétal, les huiles essentielles sont riches en composés potentiellement bioactifs. Beaucoup sont connues pour avoir une activité antimicrobienne grâce à leurs divers composés antioxydants, tels que les polyphénols, les phénols, les flavonoïdes etc. Leur activité microbienne inhérente est communément liée à la structure chimique de leurs composants actifs, à la concentration dans laquelle ils sont présents et à leurs interactions avec la matière vivante. Le fait qu'elles soient constituées par une grande variété de composés actifs, leur confère d'avantages différents modes d'action, et leur donne la capacité de cibler plusieurs fonctions au niveau de la cellule fongique. Evidemment, leur faible masse moléculaires et propriétés lipophiles, leurs permettent de traverser la membrane cellulaire fongique, provoquant ainsi des lésions irréversibles de la paroi et les organelles cellulaires, ce qui leur confère leur propriétés antifongiques. D'autres huiles essentielles ne possèdent pas un pouvoir fongicide mais sont pourtant capables d'inhiber la production de l'OTA sans affecter significativement la masse du champignon producteur.

Les huiles essentielles étudiées dans le Chapitre 1 ont montré une importante capacité d'inhibition de l'OTA sans avoir inhibé la croissance fongique. Celles-ci ont été sélectionnées afin d'évaluer leur effet sur l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'OTA chez *A. carbonarius*. Jusqu'à nos jours, uniquement trois gènes de biosynthèse de l'OTA ont été séquencé chez ce champignon (*acpkS*, *acOTApks* et *acOTAnrps*) et deux gènes de régulation (*veA* et *laeA*).

Cette évaluation a été réalisée sur un milieu nommé Synthetic Grape Medium ou SGM, dont sa composition est proche à celle du raisin, pendant 4 jours, avec une température maintenue stable à 28 °C.

II. Article publié : Essential Oils Modulate Gene Expression and Ochratoxin A Production in *Aspergillus carbonarius*, *Toxins* (8), 8-242.



Article

Essential Oils Modulate Gene Expression and Ochratoxin A Production in *Aspergillus carbonarius*

Rachelle El Khoury ^{1,2}, Ali Atoui ^{3,*}, Carol Verheecke ², Richard Maroun ¹, Andre El Khoury ¹ and Florence Mathieu ²

¹ Laboratoire de Mycologie et Sécurité Alimentaire (LMSA), Centre d'analyse et de Recherche (CAR), Campus des Sciences et Technologie, Université Saint-Joseph, Mkalles-Beyrouth 1107-2050, Lebanon; rachelle.khouryel@net.usj.edu.lb (R.E.K.); richard.maroun@usj.edu.lb (R.M.); andre.khoury@usj.edu.lb (A.E.K.)

² Laboratoire de Génie Chimique, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse 31326, France; carol.verheecke@gmail.com (C.V.); florence.mathieu@ensat.fr (F.M.)

³ Laboratory of Microbiology, Department of Natural Sciences and Earth, Faculty of Sciences I, Lebanese University, Hadath Campus, Beirut P.O Box 11-8281, Lebanon

* Correspondence: a.atoui@cnrs.edu.lb; Tel.: +961-1-450-811

Academic Editor: Antonio Moretti

Received: 21 June 2016; Accepted: 9 August 2016; Published: 19 August 2016

Abstract: Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin, mainly produced on grapes by *Aspergillus carbonarius*, that causes massive health problems for humans. This study aims to reduce the occurrence of OTA by using the ten following essential oils (E.Os): fennel, cardamom, anise, chamomile, celery, cinnamon, thyme, taramira, oregano and rosemary at 1 µL/mL and 5 µL/mL for each E.O. As a matter of fact, their effects on the OTA production and the growth of *A. carbonarius* S402 cultures were evaluated, after four days at 28° C on a Synthetic Grape Medium (SGM). Results showed that *A. carbonarius* growth was reduced up to 100%, when cultured with the E.Os of cinnamon, taramira, and oregano at both concentrations and the thyme at 5 µL/mL. As for the other six E.Os, their effect on *A. carbonarius* growth was insignificant, but highly important on the OTA production. Interestingly, the fennel E.O at 5 µL/mL reduced the OTA production up to 88.9% compared to the control, with only 13.8% of fungal growth reduction. We further investigated the effect of these E.Os on the expression levels of the genes responsible for the OTA biosynthesis (*acOTApks* and *acOTAnrps* along with the *acpk*s gene) as well as the two regulatory genes *laeA* and *vea*, using the quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) method. The results revealed that these six E.Os reduced the expression of the five studied genes, where the *ackps* was downregulated by 99.2% (the highest downregulation in this study) with 5 µL/mL of fennel E.O. As for the *acOTApks*,

acOTAnrps, *veA* and *laeA*, their reduction levels ranged between 10% and 96% depending on the nature of the E.O and its concentration in the medium.

Keywords: *Aspergillus carbonarius*; Ochratoxin A; gene expression; essential oils

1. Introduction

Mycotoxins are secondary metabolites produced by a wide range of filamentous fungi which have adverse effects on humans, animals and crops that result in illnesses and economic losses [1]. The most known mycotoxins are the aflatoxins, patulin, citrinin, fumonisin B1, zearalenone and the Ochratoxin A (OTA). In fact, OTA is produced by different species of *Aspergillus* and *Penicillium* such as *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *P. verrucosum* and *P. nordicum*. However, *A. carbonarius* is considered to be the main producer of OTA on coffee and grapes [2]. OTA has nephrotoxic, hepatotoxic, teratogenic, and immunotoxic effects on several animal species [3] and was classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) in 1993, as a possible human carcinogen (group 2B) [4]. Additionally, it was associated with the acute renal failure in humans [5] and liver cancer in animals after a long-term exposure with the molecule [6].

Chemical and physical treatments are considered to be inefficient at removing the OTA from grapes and wine without altering their organoleptic properties [7]. Hence, the awareness of the hazardous effects of chemical preservatives has led the scientific community to search for naturally occurring molecules that are able to reduce OTA production without altering the fungal growth, thus preventing its replacement by other undesired mycotoxigenic fungi.

Essential oils (E.Os), herbs and spices antimicrobial properties have been acknowledged and used since ancient times for therapy and food preservation. Thus many studies were carried out on their ability to reduce mycelial growth and/or mycotoxins production by different mycotoxigenic fungi. Soliman and Badeaa [8] found that the E.Os of the thyme, cinnamon, marigold, spearmint, basil and quyssum had inhibitory activities against the growth of *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* and *Fusarium verticillioides*. Similar results were obtained by Basílico and Basílico [9], who found that the mint and oregano E.Os also had a complete inhibitory effect on the growth of *A. ochraceus*.

To date, the biosynthetic pathway of OTA in *A. carbonarius* has not yet been completely elucidated and only few genes have been discovered. However, it was confirmed by several studies that the OTA biosynthesis pathway contains a polykétide synthase (PKS) and a non ribosomal peptide synthase (NRPS) family. A study conducted by Gallo et al. [10] identified and characterized an *acpk*s gene in *A. carbonarius* that encodes a conserved ketosynthase and acyl transferase domains, and found that the OTA production strongly depended on the expression levels of the *acpk*s gene, proving the implication of this gene in the OTA biosynthesis. Those same authors have identified the *acOTApks* gene that has a different function from *acpk*s, the previously described gene. *AcOTApks* encodes an AcOTApks protein that belongs to the (HR)-PKS family, and contains a putative methyltransferase domain likely responsible for the addition of the methyl group to the OTA polyketide structure [11]. Another characterized OTA biosynthesis gene in *A. carbonarius* is the *acOTAnrps* which was proven to be essential for OTA, OT α and OTB biosynthesis and is located about 900 nt upstream of a *pks* gene [12]. Furthermore, the OTA biosynthesis in *A. carbonarius* is

regulated by two known genes: *laeA* and *veA*. Their deletion caused a drastic decrease in the OTA production and a downregulation in the expression of the *nrps* gene [13].

Until now, the effect of E.Os on the expression of the genes responsible for OTA production in *A. carbonarius* is not yet evaluated. Therefore, the aim of this study is to evaluate the effect of 10 different E.Os (anise, rosemary, thyme, oregano, fennel, cardamom, chamomile, cinnamon, taramira and celery) at concentrations of 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, on the OTA produced by *A. carbonarius* (the main contaminant of grapes), and their influence on the expression levels of *acpk*s, *acOTApk*s, *acOTAnrps*, *laeA* and *veA* genes involved in the OTA biosynthesis, in order to choose the E.O (s) whose effects are only limited to OTA reduction without affecting the growth of *A. carbonarius*.

2. Results

2.1. Essential Oils Effect on Growth of *A. carbonarius* S402 and Its OTA Production

The effect of the ten E.Os used in this study at 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, on *A. carbonarius* dry weight, its radial growth and OTA production are shown in Table 1.

Table 1. Dry weight (g) and diameter (cm) of *Aspergillus carbonarius* S402, the OTA concentration ($\text{ng}/\text{mL}^*\text{g}$) after four days of culture at 28 °C on Synthetic Grape Medium (SGM) supplemented with ten essential oils at 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, compared to a control.

| Essential oils | Dry weight (g) | | Radial growth (cm) | | OTA concentration ($\text{ng}/\text{mL}^*\text{g}$ of dry weight) | |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---|---------------------------|
| Control | $0.36 \pm 0.05^{\text{a}}$ | | $5.1 \pm 0.01^{\text{c}}$ | | 50.58 ± 0.79 | |
| - | 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ | 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ | 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ | 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ | 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ | 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ |
| Anise | $0.38 \pm 0.01^{\text{a}}$ | $0.3 \pm 0.01^{\text{b}}$ | $4.5 \pm 0.01^{\text{c}}$ | $3.5 \pm 0.05^{\text{c,d}}$ | $16.66 \pm 0.55^*$ | $10.36 \pm 0.27^*$ |
| Cardamom | $0.36 \pm 0.005^{\text{a}}$ | $0.31 \pm 0.005^{\text{b}}$ | $4.5 \pm 0.01^{\text{c}}$ | $4.4 \pm 1^{\text{c}}$ | $13.15 \pm 0.20^*$ | $8.37 \pm 0.15^*$ |
| Celery | $0.36 \pm 0.05^{\text{a}}$ | $0.34 \pm 0.05^{\text{a}}$ | $4.1 \pm 0.05^{\text{c}}$ | $3.8 \pm 0.00^{\text{d}}$ | $16.43 \pm 0.24^*$ | $15.60 \pm 0.24^*$ |
| Chamomile | $0.36 \pm 0.005^{\text{a}}$ | $0.31 \pm 0.005^{\text{b}}$ | $5.1 \pm 0.05^{\text{c}}$ | $4.5 \pm 0.01^{\text{c}}$ | $16.54 \pm 0.26^*$ | $10.66 \pm 0.19^*$ |
| Cinnamon | No growth | No growth | N.D | N.D | N.D | N.D |
| Fennel | $0.32 \pm 0.05^{\text{b}}$ | $0.31 \pm 0.005^{\text{b}}$ | $4.1 \pm 0.05^{\text{c}}$ | $3.4 \pm 0.01^{\text{c}}$ | $6.8 \pm 0.12^*$ | $5.6 \pm 0.10^*$ |
| Oregano | No growth | No growth | N.D | N.D | N.D | N.D |
| Rosemary | $0.36 \pm 0.01^{\text{a}}$ | $0.33 \pm 0.001^{\text{a}}$ | $4.5 \pm 0.00^{\text{c}}$ | $4.5 \pm 0.00^{\text{c}}$ | $23.62 \pm 0.65^*$ | $11.03 \pm 2.80^*$ |
| Taramira | No growth | No growth | N.D | N.D | N.D | N.D |
| Thyme | $0.2 \pm 0.01^*$ | No growth | $2.1 \pm 0.01^*$ | N.D | $3.56 \pm 0.17^*$ | N.D |

The Mean of the dry weight (g) and the growth inhibition (%) the standard deviation of the triplicates are represented in this table. Statistical differences are indicated as: * = significant difference ($p < 0.01$). Data with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$). N.D: Not Detectable.

Our results showed that the radial growth, dry weight and OTA inhibition levels strongly depend on the nature of the E.O and its concentration (Table 1). The E.O of taramira, oregano and cinnamon (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) were able to reduce *A. carbonarius* S402 growth up to 100%, with no visible growth on the SGM medium; therefore, no detectable OTA concentration in the culture medium was found after HPLC (High Performance Liquid Chromatography) analysis. Although the E.O of thyme at 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ completely blocked the growth of *A. carbonarius* S402, it only decreased 48.71% of the fungal growth at 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

E.Os of the fennel, cardamom, chamomile, rosemary, anise and the celery at 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, showed a slight effect on the dry weight and radial growth of *A. carbonarius* S402 but a significant impact on the OTA production. A reduction of 88.9% in OTA was reached when 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of fennel E.O was added to the SGM medium, while it only reduced 13% of the fungal growth. Additionally, this E.O at 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ was able to reduce the OTA to 86.6%, with no significant impact on the radial growth (33.3%) and the dry weight (11%). Cardamom, chamomile, rosemary, anise and celery E.Os at 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, also had an important effect in OTA reduction that reached 74.2%, 67.5%, 53.7%, 76.6%, and 68.5% respectively, with growth reduction that ranged between 0% and 11% (cardamom and celery (0%), anise (5%), chamomile and rosemary (11%)). OTA reduction was higher, when the E.O concentrations were at 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ reaching 83.5% for cardamom E.O with only 13% of dry weight reduction. The OTA reduction percentages were almost the same for the E.Os of chamomile (79.1%), rosemary (78.3%), and celery (77.1%), with a growth reduction of 13%, 8% and 5%, respectively. Lastly, the E.O of anise reduced the fungal growth to 16% with 83.9% of OTA concentration reduction.

2.2. Microscopic Morphology Evaluation

Scanning Electron Microscopy (SEM) of *A. carbonarius* S402 treated with 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of fennel E.O compared to untreated samples showed that the application of the fennel E.O at 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ did not affect the size of the conidial head. For instance, the conidial head of the untreated samples measured 107 μm (Figure 1A), similar to the treated sample with 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (102 μm) (Figure 1C). When the SGM medium was supplemented with 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of fennel E.O, the results were different: the conidial head was smaller and more compact than those in control condition, and measured 84 μm (Figure 1E), i.e., 21.4% lesser than the control.

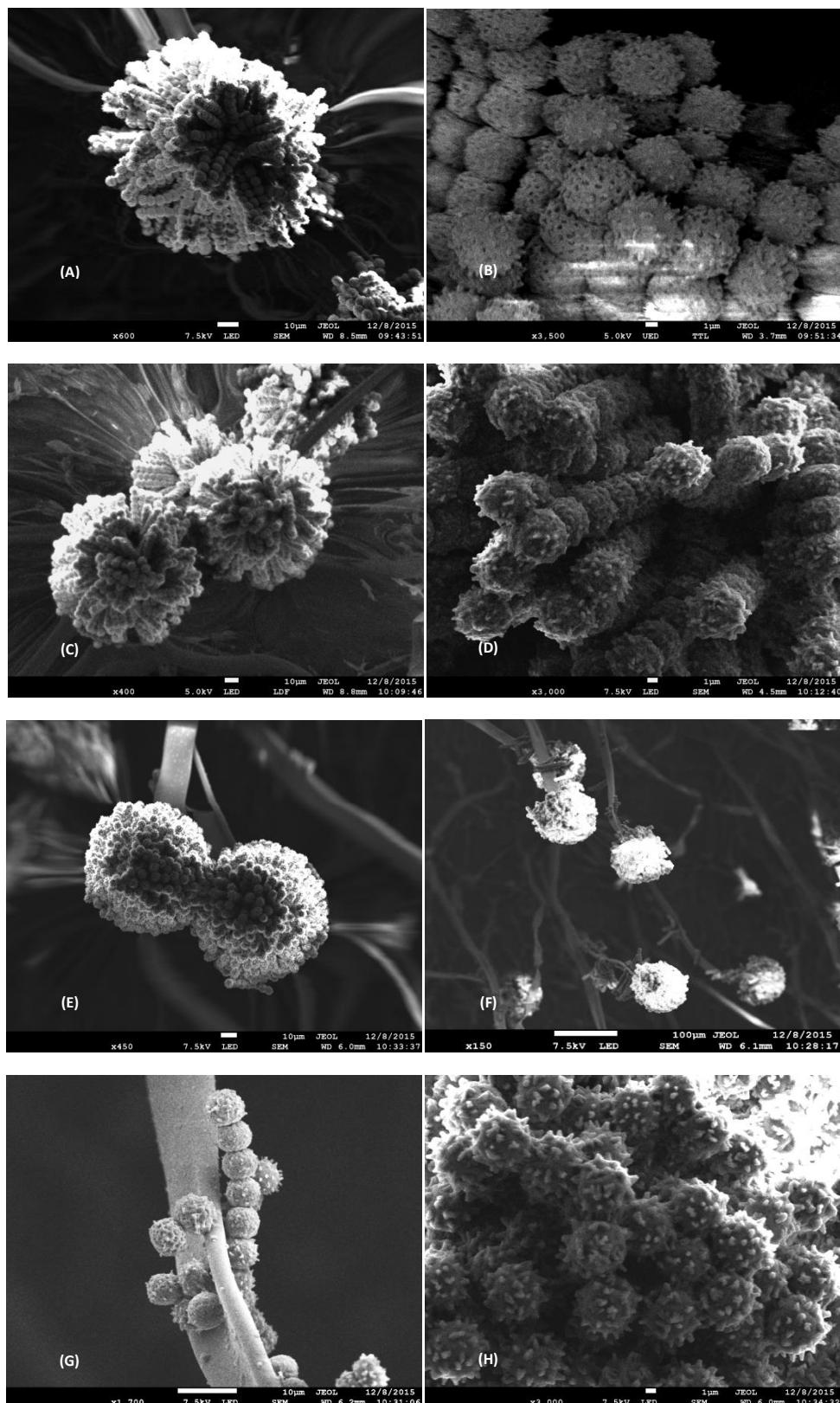


Figure 1. Scanning electron micrographs of the *Aspergillus carbonarius* S402, cultured on Synthetic Grape Medium (SGM) at 28 °C for four days: (A) *A. carbonarius* S402 conidial head; (B) spores of *A. carbonarius*; (C) *A. carbonarius* conidial head cultured with 1 µL/mL fennel oil; (D) spores of *A. carbonarius* cultured with 1 µL/mL fennel oil; (E, F) *A. carbonarius* conidial head cultured with 5

$\mu\text{L}/\text{mL}$ fennel oil; (G) conidiophores of *A. carbonarius* cultured with $5 \mu\text{L}/\text{mL}$ fennel oil with abnormally placed spores; and (H) spores of *A. carbonarius* cultured with $5 \mu\text{L}/\text{mL}$ fennel oil.

As for the spore concentration, a non-significant variation was observed between the untreated *A. carbonarius* and the cultures treated with $1 \mu\text{L}/\text{mL}$ and $5 \mu\text{L}/\text{mL}$ of fennel E.O. In fact, the results showed that the untreated samples had a concentration of 17×10^6 spores/mL, whereas the cultures treated with $1 \mu\text{L}/\text{mL}$ and $5 \mu\text{L}/\text{mL}$ of fennel E.O had a concentrations of 15.8×10^6 spores/mL and 16.1×10^6 spores/mL respectively.

2.3. Analysis of Genes Expression Involved in OTA Biosynthesis by *A. carbonarius*

To better understand the OTA reduction by the E.Os that did not affect the fungal growth, the expressions of two known biosynthetic genes involved in the OTA biosynthesis (*acOTApks* and *acOTAnrps*) as well as the *acpk*s gene and the two regulatory genes (*veA* and *laeA*) were evaluated by qRT-PCR.

The expression levels of the target genes were normalized by the expression of the reference gene (β -tubulin was chosen as reference gene, as shown in the Supplementary Material, Figure S1) and were expressed relative to the control. Table 2 shows the relative expression values of the target genes of *A. carbonarius* S402 cultured with the six E.Os, along with the OTA reduction.

Results showed that expression level of the target genes in the presence of $1 \mu\text{L}/\text{mL}$ of E.Os varied depending on the nature of the E.O. In fact the E.O of the chamomile, was able to significantly downregulate all the target genes. Others, such as cardamom, rosemary, anise, fennel and celery E.Os, were only able to affect specific genes but had no effect on the others. As a matter of fact, the *acpk*s was significantly downregulated when *A. carbonarius* was cultured with the six E.Os at $1 \mu\text{L}/\text{mL}$. Notably, its expression was reduced by 96% by the E.O of the fennel, 50% and 90% by the celery and rosemary E.Os respectively, accompanied by an OTA reduction that reached 86.9%, 68.8% and 53.7% respectively for each E.O. As for the cardamom, chamomile and anise E.Os, they were able to equally reduce this gene expression by 80% and had approximately the same effect on OTA production, as they reduced it to 74.2% and 76.9% by cardamom and anise E.O, respectively, and to 67.5% by the chamomile E.O.

As for the *acOTApks*, its expression was not downregulated by all of the six E.Os. In fact, E.O of the rosemary had no significant effect on this gene's expression while the other tested E.Os reduced the *acOTApks* by 99%, 86%, 88%, 81% and 76% for the fennel, cardamom, chamomile, anise and celery E.Os, respectively. While *acOTAnrps* expression was equally reduced by the E.Os of cardamom, chamomile and rosemary by 80%, its expression was not affected by the fennel, celery and anise E.Os.

Regarding the regulatory genes *veA* and *laeA*, they were both not affected by the E.Os of the anise and celery. The *veA* expression was reduced by approximately 90% with the E.Os of the fennel and rosemary, along with 55% and 63% by the E.Os of cardamom and chamomile respectively. As

fennel, chamomile and rosemary respectively. However, the E.O of the cardamom had no significant effect on the *laeA* expression.

At 5 µL/mL, the six E.Os were able to significantly reduce the expressions of the five studied genes. For instance, the *acpkS* was highly downregulated by the E.O of the fennel, reaching 99.2% of reduction, followed by the chamomile, rosemary, cardamom and celery E.Os with 98%, 95%, 90%, 85% and 70% reduction, respectively.

As for the *acOTApks*, its expression was reduced up to 99.9% with the fennel E.O, the highest gene downregulation in this study. Moreover, this E.O decreased the OTA production up to 88.6% yet reduced the fungal growth by only 13.6%. The E.Os of the cardamom, rosemary and chamomile also had major effects on the expression of the *acOTApks*. In fact they reduced its expression by 98%, 96% and 95%, respectively, coupled with an OTA reduction by 83.5%, 78.3% and 79.1%, respectively, for each E.O. In addition, celery and anise E.Os downregulated *acOTApks* by 81%, and 86% respectively as well as the OTA production by 77.1% and 83.9% for each E.O respectively. As for the E.O of fennel, rosemary and anise, they were able to reduce the *acOTAnrps* expression by 98% for both fennel and rosemary, and 99% for anise. Regarding the rest of the E.Os, the cardamom, celery and chamomile, they also reduced this gene expression by 84%, 82% and 52% respectively.

Table 2. Normalized relative Ochratoxin A (OTA) gene expression in *Aspergillus carbonarius* S402 observed after 4 days of culture in presence of six different E.Os at 1 µL/mL and 5 µL/mL, associated with the percentage of OTA reduction levels.

| Essential Oils | Fennel | | | | Cardamom | | | | Chamomile | | | |
|-------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| | 1 µL/mL | | 5 µL/mL | | 1 µL/mL | | 5 µL/mL | | 1 µL/mL | | 5 µL/mL | |
| Genes | Relative expression | % of OTA reduction | Relative expression | % of OTA reduction | Relative expression | % of OTA reduction | Relative expression | % of OTA reduction | Relative expression | % of OTA reduction | Relative expression | % of OTA reduction |
| <i>acpk</i> | 0.04 * | | 0.008 * | | 0.24 * | | 0.15 * | | 0.2 * | | 0.02 * | |
| <i>acOTApks</i> | 0.009 * | | 0.001 * | | 0.14 * | | 0.02 * | | 0.12 * | | 0.05 * | |
| <i>acOTAnrps</i> | 0.7 | 86.90% | 0.02 * | 88.60% | 0.2 * | 74.20% | 0.18 * | 83.50% | 0.2 * | 67.50% | 0.16 * | 79.10% |
| <i>veA</i> | 0.09 * | | 0.07 * | | 0.45 * | | 0.29 * | | 0.37 * | | 0.06 * | |
| <i>laeA</i> | 0.08 * | | 0.06 * | | 0.9 | | 0.3 * | | 0.29 * | | 0.04 * | |
| Rosemary | | | | Anise | | | | Celery | | | | |
| Essential Oils | 1 µL/mL | | 5 µL/mL | | 1 µL/mL | | 5 µL/mL | | 1 µL/mL | | 5 µL/mL | |
| | Relative expression | % of OTA reduction | Relative expression | % of OTA reduction | Relative expression | % of OTA reduction | Relative expression | % of OTA reduction | Relative expression | % of OTA reduction | Relative expression | % of OTA reduction |
| <i>acpk</i> | 0.1 * | | 0.05 * | | 0.2 * | | 0.1 * | | 0.5 * | | 0.3 * | |
| <i>acOTApks</i> | 0.9 | | 0.04 * | | 0.19 * | | 0.14 * | | 0.24 * | | 0.19 * | |
| <i>acOTAnrps</i> | 0.2 * | 53.70% | 0.02 * | 78.30% | 0.8 | 76.90% | 0.01 * | 83.90% | 0.7 | 68.50% | 0.48 * | 77.10% |
| <i>veA</i> | 0.1 * | | 0.05 * | | 0.9 | | 0.13 * | | 0.7 | | 0.12 * | |
| <i>laeA</i> | 0.2 * | | 0.09 * | | 0.7 | | 0.2 * | | 0.8 | | 0.2 * | |

Normalized gene expression of the following genes: *acpk*, *acOTApks*, *acOTAnrps*, *veA* and *laeA* along with the OTA reduction in the Synthetic Grape Medium (SGM) after four days of culture at 28° C. Statistical analysis was made using the GraphPad prism 6 software (version 6.07 for windows, 2015, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Data with (*) = significant difference ($p < 0.01$).

Finally the *veA* and *laeA* expressions were nearly the same when *A. carbonarius* was cultured with the E.Os of the fennel (93% and 94%), cardamom (71% and 70%), chamomile (94% and 96%), rosemary (95% and 91%), anise (87% and 80%) and lastly celery (88% and 80%), respectively, for each gene.

3. Discussion

Until now, studies have shown that the E.Os can reduce OTA production by reducing fungal growth. Nevertheless, few were able to prove that OTA could also be inhibited without significantly reducing the fungal growth. To that purpose, this work was dedicated to finding an E.O capable of reducing the OTA produced by *A. carbonarius*, without significantly altering its growth, thus preserving the natural balance of the microbial ecosystem and mostly preventing the occurrence of other mycotoxicogenic fungi.

However, few works were able to prove that the reduction of OTA production could be associated with the downregulation of the expression of genes responsible for the OTA biosynthesis in *A. carbonarius*. In this study, we investigated the effects of ten E.Os on OTA production by *A. carbonarius* S402 and we found that four of these E.Os, taramira, oregano, cinnamon and thyme, completely blocked OTA production by preventing the growth of *A. carbonarius* S402 cultures. These findings are consistent with other studies found in the literature, which tested the effect of some E.Os on the growth of other mycotoxicogenic fungi. In fact, Hua et al. [14] found that *A. ochraceus* fungal growth was completely blocked by using the E.O of cinnamon, a natural and synthetic cinnamaldehyde with a concentration of 500 µL/L for the three E.Os. Moreover, the antifungal activities of the cinnamon was studied over the years and proven to be effective against mould growth [8,15–17]. These results regarding the E.O of the cinnamon are consistent with our results, stating that the growth of *A. carbonarius* S402 was completely blocked with the use of this E.O. The oregano E.O also had a great antifungal activity, preventing the growth of *A. niger*, *F. oxysporum* and *Penicillium* spp. in YES broth, at a concentration of 0.1 mL/mL [18]. Additionally, the carvacrol and thymol were identified as the main components of the oregano E.O, responsible for its antifungal activities [19–21]. Similarly, the E.O of the thyme also showed an antifungal effect on the growth of *F. verticillioides*, *A. parasiticus*, *A. flavus* and *A. parasiticus* due to the presence of the thymol, thyme's main component [22–24].

However, the E.O of anise, fennel, cardamom and chamomile did not show a significant antifungal activity against *A. carbonarius* at the concentrations used in this study. The E.O of anise at 1500 µL/L, when used on *A. ochraceus* on a Malt Extract Agar medium (MEA) [14] did not show a significant effect on the growth of the fungus, which similar to our results but contradict those of Soliman and Badeaa [8] who found that at 500 ppm, this E.O blocked the growth of *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus* and *F. verticillioides* on PDA medium (Potato Dextrose Agar) after 5–7 days of culture. Furthermore, these same authors found that the E.O of the fennel at 3000 ppm blocked the growth of the four tested fungi, also contradicting with our results, stating that, even at 5 µL/mL (0.5%), this E.O only reduced *A. carbonarius* S402 growth by 13.8% compared to a control. A study conducted by Bansod and Rai [25]

fumigatus and *A. niger* was at 2% of this E.O, which means that in order to block the growth of these two fungi, a concentration 4 times higher than ours was needed. The reasons behind these differences could be numerous; first of all, they may be associated with the fact that in our study, we did not extract the E.Os from the plants but instead we bought them from the market; consequently, the extraction methods may vary and alter the antifungal activity of the E.Os. Furthermore, different species of fungi do not have similar spores density or similar growth rates (*A. carbonarius* has a negligible ratio of (spores dry weight)/(biomass dry weight) on DG18 agar medium compared to *A. flavus* and *A. ochraceus*, but it has a significantly higher biomass density than the other two fungi due to its larger conidial size compared to *A. flavus* and *A. ochraceus*, respectively) [26], consequently causing the E.Os to perform differently on different fungal species. Lastly, these contradictions may be associated with the different types of media used in both studies along with the incubation period.

According to Baydar et al. [27] the antifungal properties of E.Os can be attributed to the presence of phenolic compounds such as eugenol, anethole, carvacol, precursors r-cimene and g-terpinolene and isomers of thymol. Furthermore, they have low molecular weight and lipophilic properties that allows them to easily penetrate cell membrane [28] causing irreversible cell wall damage and cellular organelle as well as affecting the pH homeostasis and equilibrium of inorganic ions [29–31]. Another study on the mode of action of E.Os on fungal growth suggested that *A. conyzoides* E.O was able to cross the plasma membrane of *A. flavus* and interact with the membrane structures of cytoplasmic organelles thus preventing the fungal growth [32].

Regarding the expression levels of the genes involved in the OTA biosynthesis pathway, in presence of E.O, few studies were found in the literature on this topic. Nevertheless, Murthy et al. [33] noticed that the reduction of OTA production was not correlated with the growth reduction of *A. ochraceus* after inoculating the medium with increasing doses of Ajowan Ethanolic Extract (AEE). At 50 and 150 mL/g of AEE, inhibition of OTA production was higher than the reduction of fungal growth. Similarly, Hua, Xing, Selvaraj, Wang, Zhao, Zhou, Liu and Liu [14] also noticed a decreased growth of *A. ochraceus* by 75–150 mg/mL of citral E.O, but the OTA production was completely blocked, therefore suggesting that the reduction was not correlated with the growth reduction, but rather to the suppression of transcription of OTA biosynthesis genes. In fact, they found that the transcription of the *pks* gene (responsible for the synthesis of the polyketide dihydro-isocoumarin and involved in the first steps of the OTA biosynthetic pathway) was completely inhibited by 75–150 mg/mL of citral E.O. Likewise; a study conducted by Caceres et al. [34] on the reduction of aflatoxin B1 (AFB1) produced by *A. flavus* showed that all the genes (except for *aflT*) of the AFB1 cluster were drastically downregulated when *A. flavus* was cultured with 0.5 mM of eugenol, resulting an extreme AFB1 reduction with no significant impact on the fungal growth. In the same manner, our study revealed that six of the tested E.Os (anise, fennel, cardamom, chamomile, celery and rosemary) reduced significantly the OTA from the medium without equally reducing the fungal growth. These results suggest that this OTA reduction was not associated with the growth reduction but rather with the repression of certain biosynthetic genes. Fennel, cardamom, chamomile, rosemary, anise and celery E.Os downregulated *acpks*, *acOTApks*, *acOTAnrps*, *laeA* and *veA* genes, involved in the synthesis of the appropriate enzymes involved in the OTA biosynthesis. A similar study revealed that the expression of *acOTApks* gene in *A. carbonarius* was also reduced by the addition of 0.065 mg/mL of the hydroxycinnamic acids such as p-coumaric and ferulic acids [35]. Our findings suggest that the E.Os

used in this study have different ways to reduce OTA from the medium without affecting the fungal growth. Some were able to downregulate the regulatory genes (*laeA* and *veA*) such as the fennel, chamomile and rosemary E.Os at 1 μ L/mL and consequently reducing the expression of the genes responsible for the OTA biosynthesis (*acpkS*, *acOTApks* and *acOTAnrps*). Others, such as the anise and celery E.Os at 1 μ L/mL did not have significant effect on the expressions of *laeA* and *veA*, but they were able to downregulate directly the *acpkS*, *acOTApks* and *acOTAnrps* genes, suggesting that different types of E.Os has different mode of action on the OTA biosynthesis genes. Similarly, a study was conducted on *F. culmorum* cultured with 0.5 mM of ferulic acid showed that this compound reduced the trichotecene type B production by reducing up to 5.4 times the expression levels of several tri genes involved in the biosynthesis pathway [36]. Furthermore, AFB1 production was reduced by adding the caffeic acid in culture with *A. flavus*, resulting in the downregulation of the aflatoxins biosynthesis genes in *A. flavus*, reducing 6.6 fold the *aflD*, 7.1 *aflM*, 9.1 *aflP* and 1.5 *aflS* gene without affecting the fungal growth [37]. Moreover, another study conducted by Yoshinari et al. [38] found that AFG1 production in *A. parasiticus* was reduced by using E.O of the chamomile that inhibited the cytochrome P450 synthesis (CYPA), enzyme implicated in the AFG1 production. Additionally, due to the similarity between the CYPA and TRI4 (an enzyme responsible for trichothecenes early biosynthesis), the E.O of chamomile was also able to decrease the 3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON) production in *F. graminearum* by reducing the TRI4 enzyme.

Regarding the microscopic aspects of *A. carbonarius* cultured with 1 μ L/mL and 5 μ L/mL of fennel E.O, the morphology of the conidial head and the spores remained unchanged, contrary to other results found in the literature. For instance, Hua, Xing, Selvaraj, Wang, Zhao, Zhou, Liu and Liu [14] found that the treatment of *A. ochraceus* with different concentrations of natural cinnamaldehyde, citral and eugenol E.Os showed alteration in the morphology of the hyphae that appeared collapsed and abnormal, correlated with an OTA reduction. Moreover, the E.O of *Cinnamomum zeylanicum* caused an interesting inhibition of spore germination in *A. flavus*, *A. fumigatus* and *A. niger* also causing alterations in the hyphal development, a loss in pigmentation and a lack of sporulation [39]. Another similar study conducted by Sharma and Tripathi [40] showed that the E.O of *Citrus sinensis* at 0.5 μ g/mL caused a distortion of the *A. niger* mycelium, squashed and flattened the conidiophores bearing damaged conidial head. In our case, the E.O of the fennel used in this study highly reduced OTA production without altering the growth of *A. carbonarius* S402 or the microscopic aspects of the fungus.

Our findings, along with the data collected from previous studies, indicate that the use of the E.Os on food and crops could be one of the solutions to reduce the OTA from culture media produced by *A. carbonarius*. Some of these E.Os, including anise, celery, cardamom, chamomile, rosemary and fennel, were able to reduce the OTA by repressing the expressions of the genes involved in the OTA biosynthesis without particularly affecting the fungal growth; thus not altering the natural microbial balance.

4. Conclusions

The inhibitory effects of ten E.Os on the OTA production of *A. carbonarius* S402 and their effect on the expression of the genes involved in OTA biosynthesis were evaluated in this study. The E.Os

of cinnamon, thyme, oregano and taramira showed an antifungal activity and prevented the growth of *A. carbonarius* S402 cultured on SGM medium. Nevertheless, the objective of our study was to find one or several E.O that has no significant effect on *A. carbonarius* growth, but rather on OTA production. For this aim, we found that the E.O of fennel at 5 µL/mL was the most effective E.O in terms of downregulating the OTA biosynthesis and regulatory genes of *A. carbonarius*, in correlation with a drastic reduction in the OTA production. In addition, this E.O did not alter the morphology of the fungus' conidial heads or the sporulation after four days of culture on SGM medium. Similarly, the E.O of the chamomile, cardamom, celery, rosemary and the anise did not show any antifungal activities and thus did not have a significant effect on the growth of the fungus, but only reduced the OTA production by reducing the genes expressions responsible for this production.

5. Materials and Methods

5.1. Essential Oils

Ten E.Os were chosen in order to evaluate their influence on the growth of *A. carbonarius* and on OTA production: rosemary (*Rosmarinus officinalis*), anise (*Pimpinella anisum*), chamomile (*Chamaemelum nobile*), fennel (*Foeniculum vulgare*), thyme (*Thymus vulgaris*), oregano (*Origanum vulgare*), taramira (*Eruca sativ*), cinnamon (*Cinnamomum verum*), cardamom (*Elettaria cardamomum*) and celery (*Apium graveolens*). These E.Os were purchased from the local Lebanese market (Tyr, Lebanon), and were used with no additional treatment.

5.2. Strain and Culture Conditions

A. carbonarius strain S402 was provided by the LGC-UMR 5503 (Chemical Engineering Laboratories) located in the Superior National School of Agronomy, in Toulouse France. This strain was sub-cultured in Czapek-Yeast-Agar medium (CYA) as described by El Khoury, Rizk, Lteif, Azouri, Delia and Lebrihi [2] for 4 days at 28° C. A spore suspension was prepared by adding 8 mL of a sterile Tween 80 (0.005%) solution and scrapping the surface of the cultures with a sterile Pasteur Pipette (Chase Scientific Glass, Inc., Rokwood, TN, USA). The spore count was evaluated by using Neubauer haemocytometer (Superior, Marienfeld, Lauda-Konigshofen, Germany), the concentration was adjusted to 10⁶ spore/mL and spore suspension was then kept at 4° C for further use. The culture was then conducted on a Synthetic Grape Medium (SGM), prepared following the instructions described by Bejaoui et al. [41].

Each E.O (at 1 µL/mL and 5 µL/mL) was mixed to 20 mL of the SGM medium before pouring the mix into Petri dishes. In order to compare and evaluate the effect of the E.Os on *A. carbonarius* growth and on OTA production, a control culture was prepared without adding any E.O to the SGM medium. A sterilized transparent cellophane film was placed on the surface of the medium, and then 10⁶ spores of *A. carbonarius* were inoculated at the center of the film. The growth of *A. carbonarius* was estimated by the radial growth (cm) and the dry weight (g), both after 4 days of culture. *A. carbonarius* dry weight was evaluated by weighing the mycelium after its desiccation (placing the transparent film carrying the culture at 100° C for 24 h). As for the radial growth, diameters measurements of *A. carbonarius* cultures were taken after 4 days of incubation at 28° C.

All assays were carried out in triplicates for each condition.

5.3. Scanning Electron Microscopy (SEM) for Morphologic Study and Spores Count

The fennel E.O at 1 µL/mL and 5 µL/mL was chosen among the ten E.Os to observe its effect on the spores and conidia morphology of *A. carbonarius* in comparison with the control on SGM medium. This E.O was chosen in order to investigate its effect on the fungal sporulation since it had the greatest effect on the OTA production without altering significantly the growth of *A. carbonarius*. After 4 days of culture at 28° C, the fungus was desiccated at 75 °C for 24 h, prepared for the SEM by coating the samples with 40 nm of gold under vacuum and then viewed with the MEB-FEG (Field Emission Gun); model JSM 7100F (JOEL, Freising, Germany). The spore concentration was assessed using a Neubauer haemocytometer (Superior, Marienfeld, Lauda-Konigshofen, Germany), after taking 4 agar plugs from each condition and mixed with 5 mL of distilled water. The tubes were then shaken vigorously using vortex mixer for 3 min. Samples were made in triplicates and the mean number of spores was considered.

5.4. OTA Extraction and HPLC Analysis

After the incubation period, 3 agar plugs (0.5 cm diameter) were extracted from each SGM medium, placed in 3 mL microtubes and weighed. One milliliter of HPLC grade methanol was added, and the mix was incubated and shaken for 60 min at room temperature. After centrifugation at 13,000 r.p.m (round per minute), the aqueous phase was separated from the debris and diluted with 20 mL phosphate buffer. OTA was then purified using Ochraprep immunoaffinity columns (R-Biopharm, Glasgow, Scotland) by injecting the mix into the columns using a syringe. OTA was eluted by adding 1.5 mL of methanol/acetic acid (98:2, v/v) followed by 1.5 mL of distilled water. After filtering with 0.4 µm filters (Sartorius stedim, Biotech), the OTA extract was stored at 4 °C before quantification.

OTA quantification was done with a Water Alliance HPLC system using an Utisphere ODB column, C18 (150 4.6 mm, 5 µm, 120 Å) (Interchim, Montluçon, France) at 30 °C. A 30 min isocratic flow was delivered at 49% of eluent A: acidified water (0.2% of acetic acid) and 51% of eluent B: acetonitrile. A flow rate of 1 mL/min was used and 10 µL of extract were injected into the apparatus. OTA was detected by a fluorescent detector at 333/440 nm excitation/emission wavelengths. Peak identity was confirmed by analyzing absorption spectrum with a diode array detector coupled to the system. OTA concentrations were calculated based on a standard calibration curve.

5.5. RNA Extraction, cDNA Synthesis and qRT-PCR

For genes expressions analysis, culture conditions were the same as those described in Section 5.2. After 4 days at 28° C, the cellophane film was separated from the surface of the SGM medium and the mycelium was then carefully cut out from the cellophane, ground in liquid nitrogen and stored at -80° C. Total RNA was extracted from the frozen mycelium using the RNeasy kit (Qiagen, Düsseldorf, Germany) following the manufacturer protocol and then treated with DNase I Amplification Grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The quality and quantity of the total RNA was assessed using the Experion RNA analysis kit (version 3.20, 2015, BioRad, Marnes-la-Coquette, France). The single strand cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using the Advantage RT-for-PCR kit (Clontech, Mountain View, CA, USA) following the manufacturer protocol.

Gene specific primers used are listed in Table 3. The reactions were held using CFX96 Touch Real time PCR detection system Bio-Rad (version 3.0, 2012) using Sso Advanced Universal Sybr Green Supermix (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) to evaluate the cDNA amplification, by starting with 100 ng / L of freshly synthesized cDNA following the manufacturer protocol for the mix preparation and the amplification cycles, with a Tm of 58 °C. The choice of suitable reference genes was conducted by choosing six candidate genes (β -tubulin, cox5, actin, 18S, calmodulin and gpdA) used in previous studies, and their stability was tested in the conditions used in our study using the qRT-PCR (version 3.0, 2012, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) method and the geNorm software (version 3.0, 2014, Biogazelle, Ghent, Belgium). Their expression stability was assessed with qbase⁺ biogazelle software (version 3.0, 2014, Biogazelle, Ghent, Belgium) by calculating their geNorm M value (M) and their coefficient of variation on the normalized relative quantities (CV). These values can then be compared against empirically determined thresholds for acceptable stability [42]. The most stable gene is the one with the lowest M value and with a CV value that does not exceed 0.15 (M value of <0.5 and CV value of <0.15).

Table 3. List of primers used in this study.

| Primer Name | Primer Sequence (5'→3') | References | Efficiency |
|--------------------|----------------------------|------------|------------|
| acpkS-F | GAGTCTGACCACATCGACACGG | [10] | 110.0% |
| acpkS-R | GGCGACTGTGACACATCCAT | | |
| acOTApkS-F | CGTGTCCGATACTGTCTGTGA | [11] | 102% |
| acOTApkS-R | GCATGGAGTCCTCAAGAACCC | | |
| acOTAnrps-F | ATCCCCGGAATATTGGCACCC | [12] | 82.6% |
| acOTAnrps-R | CCTTCGATCAAGAGCTCCCC | | |
| laeA-F | CACCTATACAACCTCCGAACC | [13] | 104.7% |
| laeA-R | GGTTCGGCCAACCGACGACGC | | |
| veA-F | TCCCGGTTCTCACAGGCCGA | [13] | 101.3% |
| veA-R | GCTGTCCTGGTCTCCTCGTA | | |
| β -tubulin-F | CGCATGAACGTCTACTTCAACG | [43] | 95% |
| β -tubulin-R | AGTTGTTACCAGCACCAGGA | | |
| calmodulin-F | CCAGATCACCACCAAGGAGC | [44] | 105% |
| calmodulin-R | GTTATCGCGGTGAAAGACCT | | |
| 18S-F | GCAAATTACCCAATCCGAC | [44] | 98% |
| 18S-R | GAATTGCCGCCGGCTGCTG | | |
| cox5-F | CCCTGTTCTACGTCAATTCACTTGTT | [45] | 87% |
| cox5-R | TCTTCTCGGCCTGGCATACTC | | |
| actin1-F | TTGACAATGGTTGGGTATGTG | [45] | 82% |
| actin1-R | TTGACAATGGTTGGGTATGTG | | |
| gpdA-F | ACGGCAAGCTCACTGGTATGT | [45] | 110% |
| gpdA-R | CAGCCTTGATGGTCTTGTGATG | | |

The PCR efficiencies for each primer pair were determined by a serial cDNA dilution experiments, and were calculated from the slopes of the curves given by the CFX96 Touch Real time PCR detection system software (Bio-Rad).

5.6. Statistical Analysis

Data regarding the dry weight, radial growth, OTA concentrations and genes expressions were analyzed through one-way analysis of variance (ANOVA) and paired t-test using GraphPad (version 6.07 for windows, 2015, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) prism 6 software.

Supplementary Materials: The following is available online at www.mdpi.com/2072-6651/8/8/242/s1. Figure S1 Genorm M value of the six candidate reference genes: *-tubulin*, *calmodulin*, *cytochrome c oxydase subunit V (cox5)*, *18S*, *actin (actin1)* and *glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (gdpa)*. The most stable gene is the one with the lowest M value.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Research Council of Saint-Joseph University (Lebanon), and the Polytechnic National Institute of Toulouse (INPT), as well as the French Institute-Campus France and the National Council for Scientific Research, Lebanon (CNRS-L) for the financial support of Rachelle El Khoury.

Author Contributions: Florence Mathieu, Ali Atoui, Andre El Khoury and Richard Maroun conceived, supervised and designed the experiments. Rachelle El Khoury performed the experiments. Rachelle El Khoury, Ali Atoui and Florence Mathieu wrote the paper. Carol Verheecke and Ali Atoui contributed to qRT-PCR performance and data analysis.

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

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

A. carbonarius Aspergillus carbonarius

| | |
|---------|--|
| qRT-PCR | Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction |
| OTA | Ochratoxin A |
| IARC | International Agency for Research on Cancer |
| E.O | Essential oil |
| SGM | Synthetic Grape Medium |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| mM | Millimolar |
| N.D | Not detectable |
| r.p.m | Round per minute |

Supplementary material

1. Choice of a suitable reference gene for the gene expression study

In order to appropriately choose a reference gene for this study, *β-tubulin*, *calmodulin*, *cytochrome c oxydase subunit V (cox5)*, *18S*, *actin (actin1)* and *glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (gdpa)* genes were tested using the GeNorm software (version 6.07 for windows, 2015, La Jolla, California, CA, USA). Results showed that *β-tubulin* (geNorm M=0.2) and the *actin* (geNorm M=0.24) genes displayed a higher stability regardless the cultures conditions, and can be successfully used in our study as reference genes (Figure S1). For this reason, *β-tubulin* was selected as the reference gene.

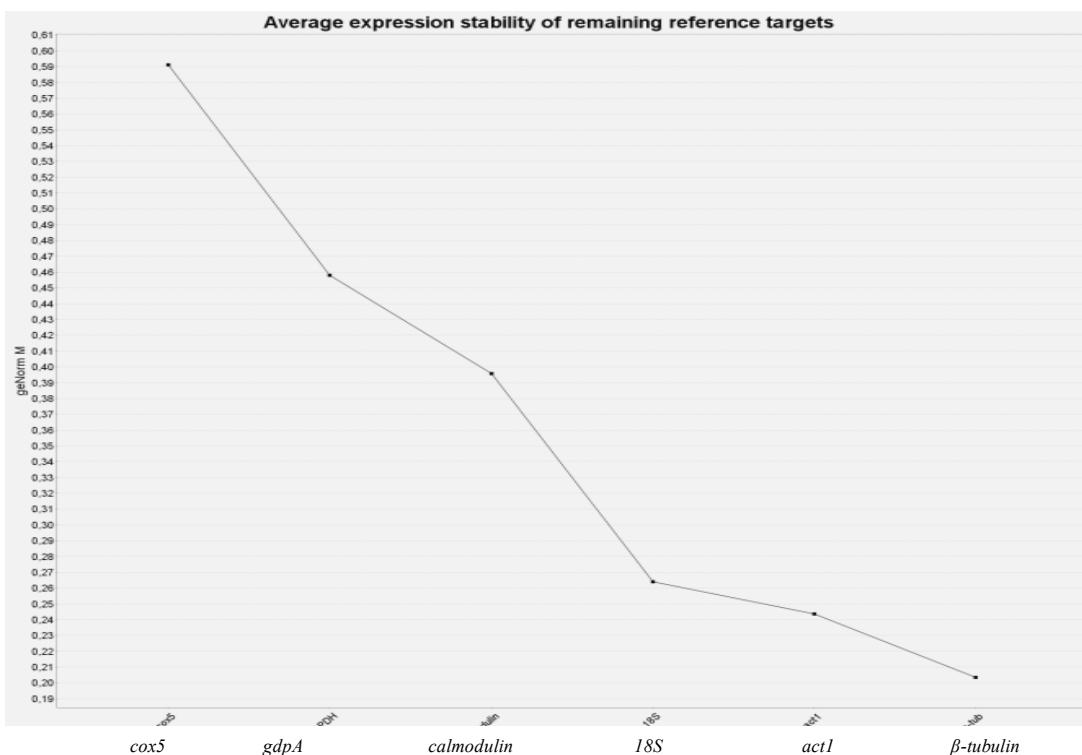


Figure S1. Genorm *M* value of the six candidate reference genes: β -tubulin, calmodulin, cytochrome c oxydase subunit V (*cox5*), 18S, actin (*actl*) and glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (*gdpA*). The most stable gene is the one with the lowest *M* value.

References

1. Reverberi, M.; Ricelli, A.; Zjalic, S.; Fabbri, A.A.; Fanelli, C. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 899–911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. El Khoury, A.; Rizk, T.; Lteif, R.; Azouri, H.; Delia, M.-L.; Lebrihi, A. Occurrence of ochratoxin A- and aflatoxin B1-producing fungi in lebanese grapes and ochratoxin A content in musts and finished wines during 2004. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8977–8982. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ponsone, M.L.; Chiotta, M.L.; Combina, M.; Torres, A.; Knass, P.; Dalcerio, A.; Chulze, S. Natural occurrence of ochratoxin A in musts, wines and grape vine fruits from grapes harvested in argentina. *Toxins* **2010**, *2*, 1984–1996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. IARC. Some Naturally Occuring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins; IARC: Lyon, France, 1993; Volume 56, pp. 489–521.
5. Abouzied, M.; Horvath, A.; Podlesny, P.; Regina, N.; Metodiev, V.; Kamenova-Tozeva, R.; Niagolova, N.; Stein, A.; Petropoulos, E.; Ganev, V. Ochratoxin A concentrations in food and feed from a region with balkan endemic nephropathy. *Food Addit. Contam.* **2002**, *19*, 755–764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Mantle, P.G.; Faucet-Marquis, V.; Manderville, R.A.; Squillaci, B.; Pfohl-Leszkoowicz, A. Structures of covalent adducts between DNA and ochratoxin A: A new factor in debate about genotoxicity and human risk assessment. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *23*, 89–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Abrunhosa, L.; Serra, R.; Venâncio, A. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7493–7496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Soliman, K.; Badeaa, R. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxicogenic fungi. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40*, 1669–1675. [[CrossRef](#)]
9. Basílico, M.Z.; Basílico, J.C. Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* nrrl 3174 growth and ochratoxin A production. *Lett. Appl. Microbiol.* **1999**, *29*, 238–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Gallo, A.; Perrone, G.; Solfrizzo, M.; Epifani, F.; Abbas, A.; Dobson, A.D.; Mule, G. Characterisation of a pks gene which is expressed during ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *129*, 8–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

11. Gallo, A.; Knox, B.P.; Bruno, K.S.; Solfrizzo, M.; Baker, S.E.; Perrone, G. Identification and characterization of the polyketide synthase involved in ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *179*, 10–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Gallo, A.; Bruno, K.S.; Solfrizzo, M.; Perrone, G.; Mule, G.; Visconti, A.; Baker, S.E. New insight into the ochratoxin A biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *Aspergillus carbonarius*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 8208–8218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Crespo-Sempere, A.; Marin, S.; Sanchis, V.; Ramos, A.J. Vea and Iaea transcriptional factors regulate ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *166*, 479–486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Hua, H.; Xing, F.; Selvaraj, J.N.; Wang, Y.; Zhao, Y.; Zhou, L.; Liu, X.; Liu, Y. Inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus ochraceus* growth and ochratoxin A production. *PLoS ONE* **2014**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ryu, D.; Holt, D.L. Growth inhibition of *Penicillium expansum* by several commonly used food ingredients. *J. Food Prot.* **1993**, *56*, 862–867.
16. Sinha, K.; Sinha, A.; Prasad, G. The effect of clove and cinnamon oils on growth of and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **1993**, *16*, 114–117. [[CrossRef](#)]
17. Patkar, K.; Usha, C.; Shetty, H.S.; Paster, N.; Lacey, J. Effect of spice essential oils on growth and aflatoxin b1 production by *Aspergillus flavus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **1993**, *17*, 49–51. [[CrossRef](#)]
18. Daouk, R.K.; Dagher, S.M.; Sattout, E.J. Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* l. *J. Food Prot.* **1995**, *58*, 1147–1149.
19. Lukas, B.; Schmiderer, C.; Franz, C.; Novak, J. Composition of essential oil compounds from different syrian populations of *Origanum syriacum* L. (lamiaceae). *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1362–1365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Soković, M.; Tzakou, O.; Pitarokili, D.; Couladis, M. Antifungal activities of selected aromatic plants growing wild in greece. *Food/Nahrung* **2002**, *46*, 317–320. [[CrossRef](#)]
21. da Cruz Cabral, L.; Fernandez Pinto, V.; Patriarca, A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *166*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Omidbeygi, M.; Barzegar, M.; Hamidi, Z.; Naghdibadi, H. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control* **2007**, *18*, 1518–1523. [[CrossRef](#)]
23. Rasooli, I.; Abyaneh, M.R. Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control* **2004**, *15*, 479–483. [[CrossRef](#)]
24. Dambolena, J.S.; Lopez, A.G.; Canepa, M.C.; Theumer, M.G.; Zygadlo, J.A.; Rubinstein, H.R. Inhibitory effect of cyclic terpenes (limonene, menthol, menthone and thymol) on *Fusarium verticillioides* mrc 826 growth and fumonisin b1 biosynthesis. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinol.* **2008**, *51*, 37–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Bansod, S.; Rai, M. Antifungal activity of essential oils from indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. Niger*. *World J. Med. Sci.* **2008**, *3*, 81–88.
26. Marín, S.; Ramos, A.J.; Sanchis, V. Comparison of methods for the assessment of growth of food spoilage moulds in solid substrates. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *99*, 329–341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Baydar, H.; Sagdiç, Ö.; Özkan, G.; Karadogan, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from origanum, thymbra and satureja species with commercial importance in turkey. *Food Control* **2004**, *15*, 169–172. [[CrossRef](#)]
28. Pawar, V.; Thaker, V. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses* **2006**, *49*, 316–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Helal, G.; Sarhan, M.; Abu Shahla, A.; Abou El-Khair, E. Effects of *cymbopogon citratus* l. Essential oil on the growth, morphogenesis and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* mL2-strain. *J. Basic Microbiol.* **2007**, *47*, 5–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Lambert, R.; Skandamis, P.N.; Coote, P.J.; Nychas, G.J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *91*, 453–462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Rasooli, I.; Owlia, P. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2851–2856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Esper, R.H.; Gonçalez, E.; Felicio, R.C.; Felicio, J.D. Fungicidal activity and constituents of *Ageratum conyzoides* essential oil from three regions in são paulo state, brazil. *Arq. Inst. Biol.* **2015**, *82*, 1–4. [[CrossRef](#)]
33. Murthy, P.S.; Borse, B.B.; Khanum, H.; Srinivas, P. Inhibitory effects of ajowan (*trachyspermum ammi*) ethanolic extract on *A. ochraceus* growth and ochratoxin production. *Turk. J. Biol.* **2009**, *33*, 211–217.

34. Caceres, I.; El Khoury, R.; Medina, A.; Lippi, Y.; Naylies, C.; Atoui, A.; El Khoury, A.; Oswald, I.P.; Bailly, J.D.; Puel, O. Deciphering the anti-aflatoxinogenic properties of eugenol using a large-scale q-PCR approach. *Toxins* **2016**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Ferrara, M.; Gallo, A.; Scalzo, R.L.; Haidukowski, M.; Picchi, V.; Perrone, G. Inhibition of ochratoxin a production in *Aspergillus carbonarius* by hydroxycinnamic acids from grapes. *World Mycotoxin J.* **2015**, *8*, 283–289. [[CrossRef](#)]
36. Boutigny, A.L.; Barreau, C.; Atanasova-Penichon, V.; Verdal-Bonnin, M.N.; Pinson-Gadais, L.; Richard-Forget, F. Ferulic acid, an efficient inhibitor of type b trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in Fusarium liquid cultures. *Mycol. Res.* **2009**, *113*, 746–753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kim, D.; Yukl, E.T.; Moënne-Loccoz, P.; Ortiz de Montellano, P.R. Fungal heme oxygenases: Functional expression and characterization of Hmx1 from *Saccharomyces cerevisiae* and Cahmx1 from *candida albicans*. *Biochemistry* **2006**, *45*, 14772–14780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Yoshinari, T.; Yaguchi, A.; Takahashi-Ando, N.; Kimura, M.; Takahashi, H.; Nakajima, T.; Sugita-Konishi, Y.; Nagasawa, H.; Sakuda, S. Spiroethers of german chamomile inhibit production of aflatoxin G1 and trichothecene mycotoxin by inhibiting cytochrome p450 monooxygenases involved in their biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **2008**, *284*, 184–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Carmo, E.S.; Lima, E.D.O.; Souza, E.L.D.; Sousa, F.B.D. Effect of *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil on the rowth and morphogenesis of some potentially pathogenic *Aspergillus* species. *Braz. J. Microbiol.* **2008**, *39*, 91–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Sharma, N.; Tripathi, A. Effects of *citrus sinensis* (L.) osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) van tieghem. *Microbiol. Res.* **2008**, *163*, 337–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Bejaoui, H.; Mathieu, F.; Taillandier, P.; Lebrihi, A. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *saccharomyces* strains. *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *97*, 1038–1044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Hellmanns, J.; Mortier, G.; De Paepe, A.; Speleman, F.; Vandesompele, J. Qbase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* **2007**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Cabañas, F.J.; Bragulat, M.R.; Castellá, G. Characterization of nonochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from grapes. *Food Microbiol.* **2013**, *36*, 135–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information. Available online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed on 30 January 2014).
45. Verheeke, C.; Liboz, T.; Anson, P.; Diaz, R.; Mathieu, F. Reduction of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in interaction with streptomyces. *Microbiology* **2015**, *161*, 967–972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



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

III. Conclusion

Parmi les dix huiles essentielles testées, quatre ont pu inhiber la croissance d'*A. carbonarius* S402 dont l'huile essentielle du thym, de l'origan, du taramira et de la cannelle. Ces dernières, vu leur pouvoir antifongique, ont été exclues de l'étude sur l'expression des gènes de biosynthèse de l'OTA chez *A. carbonarius*.

Ces travaux ont permis d'associer la réduction de la production de l'OTA (non linéaire avec la réduction de la croissance fongique) à la répression des gènes de biosynthèse, surtout l'*acOTApks* (99%) en présence de l'huile essentielle du fenouille à 5 µL/mL.

Toutes les huiles ont pu affecter l'expression des deux gènes de régulation *veA* et *laeA*. Les niveaux de réduction les plus élevés ont été atteint quand les huiles ont été employées à 5 µL/mL : le fenouil (30 et 40%), la cardamome (71 et 70%), la camomille (94 et 96%), le romarin (95 et 91%), l'anis (87 et 80%) et le céleri (88 et 80%) respectivement pour *veA* et *laeA*.

Nous avons également démontré que l'huile essentielle du fenouil n'a pas engendré des changements sévères dans la morphologie microscopique d'*A. carbonarius*. En effet son emploi n'a eu aucun effet sur la sporulation pourtant elle a provoqué une faible diminution dans la taille des têtes conidiales (21.4% de réduction comparées au control).

Chapitre 3

Détoxification de l'OTA par des actinobactéries isolées du sol : adhésion, biodégradation et répression des gènes de biosynthèse de l'OTA chez *Aspergillus carbonarius*

I. Introduction

Malgré l'efficacité des méthodes préventives, la détoxification de l'OTA des denrées alimentaires reste une nécessité afin de délivrer des produits qui respectent les normes imposées et qu'ils soient consommables par les êtres humains. Pour cela, nous nous sommes intéressés de poursuivre la lutte contre l'OTA non seulement pour prévenir sa production, mais aussi pour réduire sa présence des matrices alimentaires.

Suite à une étude bibliographique approfondie sur cette thématique, nous avons choisi d'examiner l'effet des souches d'actinomycètes, vu leur capacité à endurer les conditions climatiques chaudes et leur présence ubiquitaire dans le sol.

En effet, les actinobactéries sont rarement évaluées pour leur capacité de réduire les mycotoxines, pourtant les études sur les bactéries lactiques sont nombreuses sur cet égard. L'inconvénient de l'application de ces dernières revient à leur pouvoir de fermentation lactique, qui, dans certains cas, n'est pas désirée.

Afin d'établir un profil propre à chaque souche, nous avons procéder à tester leur capacité à (1) adhérer l'OTA à leur surface, (2) dégrader l'OTA et (3) prévenir la production de cette toxine en réprimant les gènes responsables de sa biosynthèse chez *A. carbonarius*.

L'étude de l'adhésion a été réalisée dans une solution non nutritive PBS (Phosphate Buffer Solution) afin de prévenir la biodégradation de l'OTA et avoir des faux positifs.

Cependant, la biodégradation de cette toxine a été évaluée dans un milieu nutritif nommé ISP2 liquide (International *Streptomyces* Project-2) pendant 5 jours à 28 °C.

Afin d'éliminer l'effet de l'adhésion de l'OTA par ces bactéries, nous avons testé la capacité des surnageants bactériens à métaboliser l'OTA.

Finalement, nous nous sommes intéressés d'évaluer l'influence des souches d'actinomycètes sur l'expression des gènes de biosynthèse de l'OTA. Cette étude a été

réalisée suite à une coculture entre *A. carbonarius* S402 et les souches bactériennes sur un milieu solide nommé PDA (Potato Dextrose Agar), avec une température de 28 °C pendant 5 jours de culture.

Ce travail a permis d'établir un profil de détoxification propre à chaque souche, puisque chacune d'entre elle a réagit d'une manière différente des autres. Certaines (AT8, AT10 et SN7) ont pu dégrader l'OTA sans avoir aucun effet sur l'expression des gènes. D'autres (ML5, G10 et PT1) ont affecté d'une manière significative cette expression tout en gardant leur capacité de dégradation. Toutes les souches ont montré un pouvoir d'adhésion de l'OTA sur leur surface, surtout après 60 minutes d'incubation.

II. Article soumis dans la revue *Toxins*



Article

Ability of Soil Isolated Actinobacteria Strains to Prevent, Bind and Biodegrade Ochratoxin A

Abstract: Ochratoxin A (OTA) is one of the most important mycotoxin that contaminates several agricultural products, more particularly cereals, grapes, maize, barley, spices and coffee. The aim of this project was to reduce the levels of OTA by supplementing the artificially contaminated solutions with seven strains of actinobacteria (AT10, AT8, SN7, MS1, ML5, G10 and PT1) in order to evaluate their capacity on binding and metabolizing the OTA as well as their ability to reduce the expression of the genes responsible for its production in *A. carbonarius*. In the first part of this study, we evaluated the capacity of *Streptomyces* strains on binding OTA on their surfaces after 0, 30 and 60 minutes of incubation with PBS solution supplemented with OTA. In the second part, we tested the ability of these strains as well as their supernatants to detoxify the ISP2 medium. Finally, we studied the effect of the *Streptomyces* cocultured with *Aspergillus carbonarius* on the expression of the OTA biosynthesis genes. Results showed that among the strains co-cultured with *A. carbonarius*, the strain G10 was able to reduce the expression of *acpk*, *acOTApks*, *acOTAnrps* and *vea* genes, thus reducing OTA from solid PDA medium to 13.50% of reduction. This strain was remarkably able to detoxify and bind OTA up to 47.07%. Strain AT8 was stronger in detoxifying OTA (52.61%) but had no significant effect on the studied genes expression.

Keywords: Ochratoxin A; actinobacteria; biocontrol; binding; detoxification; genes expression

1. Introduction

Ochratoxin A (OTA) is a secondary metabolite produced by molds of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* on several food commodities in pre and post-harvest conditions [1-3]. The dangerous effects of OTA on human health (carcinogen group 2B) [4] as well as its impact on economic losses [5], made the prevention of this toxin production and/or detoxification from food an important task for the scientific community. Several biocontrol approaches were elaborated to prevent the fungal growth or the production of OTA with plant extracts, more particularly essential oils and phenolic compounds [6-8]. Others were focused on treating the contaminated food with living organisms such as lactic acid bacteria (LAB) and yeasts, to reduce the OTA concentration. This biological decontamination is either performed by OTA biodegradation using microorganisms and their enzymes [9-11], or by binding the toxin on the cell wall surface of these microorganisms [12-14]. Both approaches helped reduce OTA without significant losses in nutritive values since no harmful chemicals were used in this treatment of contaminated food [15-18]. For instance, *Lactobacillus bulgaricus* was able to biodegrade 94% of the OTA added to the cultures after 24h of incubation [19]. Similarly, *Saccharomyces cerevisiae* eliminated 41% of OTA via enzymatic degradation after 24h at 30 °C. On the other hand, Turbic, *et al.* [20] claimed that OTA reduction by *Lb. rhamnosus* strains (76% of reduction) was caused by the adsorption of this toxin onto the LAB cell walls, since the acid treated bacteria were more effective to remove OTA than the viable ones after 2h at 37 °C.

Actinobacteria are Gram-positif bacteria that can be found in soil, and contain *Streptomyces* one of the largest of bacterial genera. *Streptomyces* and other actinobacteria are major contributors to biological buffering of soils, and are a source of many antibiotics [21,22]. The antifungal and antimycotoxicogenic effects of actinobacteria were tested by Verheecke, *et al.* [23], when they evaluated the effect of 16 strains of *Streptomyces* on aflatoxin B (AFB) detoxification, and found that reduction levels ranged between 15.6 and 82.2% for the tested strains. When they further investigated the reason behind these reductions, they found that AFB inhibitions were not related to adsorption, but rather to the repression of AFB biosynthesis genes in *A. flavus*. Nevertheless, the ability of *Streptomyces* on reducing OTA has not been yet established. Hence, the aim of this study was to evaluate the effect of seven *Streptomyces* strains named AT10, AT8, SN7, MS1, ML5, G10 and PT1 on OTA levels, and investigate the mode of action of each strain whether they degrade OTA, bind it to their cell walls, as well as their effect on the expression of the genes responsible for OTA biosynthesis (*acpk*s, *acOTApk*s, *acOTAnrps*) and the regulatory genes (*veA* and *laeA*) in *A. carbonarius* S402.

2. Results

2.1. Kinetics of OTA binding to actinobacterial cell wall

The PBS contaminated with 45.12 ng/mL of OTA and inoculated with the tested bacterial strains was examined after 0, 30 and 60 minutes for the remaining OTA concentration. Reductions were all significant compared to the control. Nevertheless, the levels were not the same for all the strains (Table 1). For example, AT10, AT8, SN7, G10 and PT1 were the most effective strains, as they reduced 25.62, 16.07, 33.93, 16.23 and 24.85% respectively, after 60 min of incubation. Levels of inhibition were higher at 60 min than at 30 min for all the strains. Since this study was handled in a non nutritive solution (PBS), the observed reductions could not be attributed to an enzymatic activity of the actinobacteria. Moreover, the sums of the reduced OTA with the washed OTA extracted from the pellets were equal to the initial concentration (45.12±1.2). This observation confirms that the reduced OTA is only due to the ability of the strains to bind OTA onto their cell walls.

Table 1: Kinetics of OTA binding to actinobacterial strains in PBS solution for 0, 30 and 60 mins.

| Strains | Time (mins) | OTA concentration in PBS(ng/ml)(% of reduction) | OTA concentration after bacterial pellet washing (ng/ml) |
|---------|-------------|---|--|
| AT10 | 0 | 45.12±1.2 ^a | |
| | 0 | 39.59±1.1 ^e (12.37) | 5.53±0.12 |
| | 30 | 38.19±0.9 ^d (15.46) | 6.82±0.09 |
| AT8 | 60 | 33.60±0.91 ^c (25.62) | 11.42±0.08 |
| | 0 | 41.64±1.12 ^f (7.82) | 3.13±0.10 |
| | 30 | 39.75±1.4 ^e (12.02) | 5.19±0.02 |
| SN7 | 60 | 37.92±1.2 ^d (16.07) | 7.06±0.10 |
| | 0 | 43.40±1.8 ^g (3.94) | 1.68±0.20 |
| | 30 | 39.96±1.1 ^e (11.55) | 4.425±0.01 |
| MS1 | 60 | 29.85±0.47 ^b (33.93) | 15.13±0.31 |
| | 0 | 43.73±0.4 ^g (3.20) | 0.64±0.01 |
| | 30 | 43.26±0.7 ^g (4.25) | 0.74±0.01 |
| ML5 | 60 | 41.88±1.1 ^f (4.33) | 1.54±0.01 |
| | 0 | 43.00±0.9 ^g (4.82) | 1.79±0.04 |
| | 30 | 42.45±0.84 ^f (6.03) | 1.73±0.01 |
| G10 | 60 | 40.85±0.1 ^e (9.46) | 2.65±0.40 |
| | 0 | 40.68±1.02 ^e (9.95) | 3.50±0.31 |
| | 30 | 39.45±1.1 ^e (12.68) | 4.67±0.10 |
| PT1 | 60 | 37.82±0.9 ^d (16.28) | 6.73±0.10 |
| | 0 | 41.01±0.1 ^f (9.23) | 3.06±0.12 |
| | 30 | 39.88±0.41 ^e (11.73) | 4.39±0.20 |
| | 60 | 33.95±0.1 ^c (24.85) | 10.62±1.02 |

The Mean of the OTA concentrations ± the standard deviation (% of OTA reduction) of the triplicates are represented in this table. Statistical differences are indicated as: * = significant difference ($p < 0.01$). Data with the same letters are not significantly different.

2.2. Detoxification of OTA by Actinobacterial Strains and Their Supernatant

After the culture of each actinobacterial strain in ISP2 liquid medium at 28 °C for 5 days, their supernatant was added to ISP2 medium containing 95.45±1.7 ng/mL of OTA (initial concentration). After the incubation period (5 days at 28 °C), results (Table 2) showed that all the supernatants have the ability to degrade the OTA initially added to the cultures. More particularly, the highest degradation levels were obtained with AT8 supernatant (22.42%) after 5 days of culture. On the other hand, PT1 supernatant was only able to decrease 14.08% of the initial OTA concentration, whereas the supernatants of SN7, MS1 and G10 strains reduced it by the same manner (16.08, 16.83 and 16.46% respectively for each strain). Nevertheless, the culture of the actinobacteria strains with 95.45±1.7 ng/mL of OTA in ISP2 liquid medium (5 days at 28 °C) resulted in higher reductions. The lowest OTA concentrations were found when AT10 and SN7 were added to the medium, with 51.94 and 52.68% of reduction, higher than 2.4 and 3.2 times from their corresponding supernatants. The lowest detoxification activity was obtained with MS1 strain, reducing OTA by 22.83% only. Statistically, AT8 and PT1 had similar reduction activity (42.13 and 44.97%).

Table 2: OTA detoxification activities of actinobacteria strains and their corresponding supernatants.

| Strains | Detoxification activity of the actinobacterial strains | Detoxification activity of the supernatants |
|---------|---|---|
| | OTA concentration with strains (ng/mL) (% of reduction) | OTA concentration with supernatant (ng/mL) (% of reduction) |
| Control | 95.45±1.7 ^a | 95.45±1.7 ^a |
| AT10 | 45.84±1.05 ^{*b} (51.94) | 75.51±1.4 ^{*b} (20.89) |
| AT8 | 55.23±0.7 ^{*c} (42.13) | 74.05±2.8 ^{*b} (22.42) |
| SN7 | 45.16±1.13 ^{*b} (52.68) | 80.10±2.4 ^{*c} (16.08) |
| MS1 | 73.65±0.6 ^{*d} (22.83) | 79.38±1.7 ^{*c} (16.83) |
| ML5 | 63.70±1.13 ^{*e} (33.24) | 75.69±0.43 ^{*b} (20.70) |
| G10 | 59.52±2.6 ^{*f} (37.65) | 79.73±0.7 ^{*c} (16.46) |
| PT1 | 52.52±1.25 ^{*c} (44.97) | 82.01±1.03 ^{*d} (14.08) |

The Mean of the OTA concentrations± the standard deviation (% of OTA reduction) of the triplicates are represented in this table. Statistical differences are indicated as: * = significant difference ($p < 0.01$). Data with the same letters are not significantly different.

2.3. Effect of actinobacteria on *A. carbonarius* dry weight, OTA production and genes expression

After the coculture period of *A. carbonarius* S402 and the studied strains of *Streptomyces* the effect of each strain on the dry weight of *A. carbonarius*, its radial growth and OTA production are represented in Table 3.

Table 3: The fungal dry weight (g), radial growth (cm) and OTA production (ng/mL) of *A. carbonarius* S 402 in coculture with AT10, AT8, SN7, MS1, ML5, G10 and PT1 on PDA medium at 28 °C for 5 days.

| Strain | Fungal Dry Weight (g) | Radial Growth (cm) | OTA production (ng/mL) (% of reduction) |
|---------|--------------------------|------------------------|--|
| Control | 3.06±0.015 ^a | 4.5±0.35 ^a | 14.45±0.33 ^a |
| AT10 | 3.17±0.02 ^{*d} | 4.9±0.1 ^{*d} | 13.73±0.56 ^a (4.90%) |
| AT8 | 3.08±0.01 ^a | 3.8±0.05 ^{*b} | 13.68±0.16 ^a (5.32%) |
| SN7 | 3.01±0.01 ^a | 3.7±0.1 ^{*b} | 13.90±0.09 ^a (3.78%) |
| MS1 | 2.84±0.015 ^{*c} | 4.3±0.05 ^a | 10.99±0.28 ^{*c} (23.94%) |
| ML5 | 2.75±0.01 ^{*c} | 4.0±0.02 ^{*c} | 12.47±0.22 ^{*b} (13.70%) |
| G10 | 3.03±0.01 ^a | 4.25±0.04 ^a | 12.51±0.09 ^{*b} (13.50%) |
| PT1 | 2.08±0.01 ^{*b} | 2.15±0.1 ^{*e} | 12.76±0.20 ^{*b} (11.69%) |

The Means of the fungal dry weight (g), the radial growth (cm) and the OTA concentrations (ng/mL) ± the standard deviation of the triplicates are represented in this table. Statistical differences are indicated as: * = significant difference ($p < 0.01$). Data with the same letters are not significantly different.

Results showed that each strain of *Streptomyces* affected *A. carbonarius* S402, whether on its dry weight, radial growth and/or OTA production. For instance, PT1 reduced the radial growth *A. carbonarius* (52.2%), and resulted in the reduction of dry weight (32.02%) and OTA production (11.69% of reduction). On the other hand, MS1 reduced OTA by 23.91% (the highest reduction in this study) and reduced the dry weight by only 7.1% without significantly affecting the radial growth. The strains ML5 and G10 reduced OTA in the same manner (13.70 and 13.50% respectively) while AT10, AT8 and SN7 had no significant effect the OTA production. In order to better understand these differences in OTA reduction, we further investigated the expression of the genes involved in OTA biosynthesis (*acpk*s, *acOTApk*s, *acOTAnrps*, *veA* and *laeA*) in *A. carbonarius* S402 (Table 4).

Table 4: Normalized expressions of the genes involved in OTA production in *A. carbonarius* S402 after five days of coculture at 28 °C with AT10, AT8, SN7, MS1, ML5, G10 and PT1 on PDA.

| Strains | AT10 | AT8 | SN7 | MS1 | ML5 | G10 | PT1 |
|------------------|--------------------------------|-------|-------|--------|--------|--------|-------|
| Gene | Normalized relative expression | | | | | | |
| <i>acpkS</i> | 1.00 | 1.02 | 0.99 | 0.629* | 0.61* | 0.91* | 0.99 |
| <i>acOTApks</i> | 0.998 | 1.02 | 1.01 | 0.761* | 0.77* | 0.817* | 1.01 |
| <i>acOTAnrps</i> | 1.01 | 0.993 | 0.992 | 0.79* | 0.881* | 0.881* | 0.992 |
| <i>laeA</i> | 1.01 | 1.01 | 1.03* | 1.09* | 1.01 | 1.01 | 1.03* |
| <i>veA</i> | 0.998 | 0.98* | 0.9* | 0.886* | 1.00 | 0.93* | 0.9* |

Statistical analysis was made using the STATGRAPHICS Centurion XVI (version 16.1.11 for windows, 2010, StatPoint Technologies Inc. Warrenton, VA, USA). Data with (*) = significant difference ($p < 0.01$).

The OTA biosynthesis genes (*acpkS*, *acOTApks*, *acOTAnrps*) as well as the regulatory genes (*laeA* and *veA*) in *A. carbonarius* were affected by the presence of the different tested strains. The strains MS1, G10 and ML5 had the greater impact on the repression of the three biosynthesis genes *acpkS* (37.1, 9.0 and 39.0% respectively for each strain), *acOTApks* (23.9, 18.3 and 23.0% respectively) and *acOTAnrps* (21% for MS1 and 11.9% for both G10 and ML5). These gene repressions were in correlation with OTA reductions described in Table 4. Other strains such as AT10, AT8, SN7 and PT1 had no significant effect on the expression those genes. As for the regulatory genes, the expression of *laeA* was not regulated by any of the strains. On the other hand, it was slightly down-regulated by SN7 and PT1 (3% equally for both strains), and MS1 (increased by 9%), while the 4 other strains (AT10, AT8, G10 and ML5) had no significant effect on *laeA*. The expression of the second regulatory gene *veA* was down-regulated by AT8, SN7, MS1, PT1 and G10 by 2.0, 10.0, 11.4, 10.0 and 7% respectively for each strain. Both AT10 and ML5 did not affect the expression of this gene. These results showed that the down-regulation in the expression of the biosynthesis genes, caused by MS1, ML5 and G10 strains, induced a reduction in the OTA production. As for the strains that did not significantly affect the expression of the studied genes, their presence in the culture medium did not alter the production of OTA by *A. carbonarius*.

3. Discussion

The preventive OTA techniques should in some cases be performed with detoxification approaches, in order to fully reduce the levels of this toxin from food and feed. This study was intended to this purpose, by testing different strains of actinobacteria on their ability to bind, degrade and prevent OTA production, in *in vitro* conditions. Lactic bacteria and yeasts are known for their ability to bind diverse molecules such as killer toxins and metal ions to their cell wall surfaces [12-14]. In the first part of this study, we investigated the capacity of seven actinobacteria strains to bind OTA to their surfaces. Results showed that each of the seven strains was capable of binding OTA but with different levels. Indeed the strain SN7 recorded the highest binding capacity (33.93%) after 60 min of contact. AT10 and PT1 were equally effective in reducing OTA by 25.62 and 24.85%, respectively. Similarly, AT8 and G10 decreased OTA concentration from 45.12 ng/ml to 37.92 and 37.82 ng/ml respectively. The others, MS1 and ML5, had only a slight impact on binding OTA to their walls. This type of detoxification was observed with heat and acid treated *Lacobacillus rhamnosus* strains and oenological *Saccharomyces* strains that were more effective at removing OTA than viable cells in PBS [11,20]. Piotrowska and Zakowska [24] found that 1 mg of OTA was decreased by 70 and 87% with respectively *L. acidophilus* and *L. rhamnosus* after 5 days at 37 °C. The binding mechanism of OTA and other mycotoxins by bacterial strains was explained by several authors. Pereyra, *et al.* [25] tested two yeast wall cells (YCW1 and YCW2) on their ability to bind OTA, both containing mannans and β-glucans but with different percentages (21 and 5.9% of mannans and 23 and 17.4% of β-glucans for YCW1 and YCW2 respectively). These authors noticed that these differences in polysaccharide did not affect the ability of those components to bind OTA. Similar results were obtained by Yiannikouris, *et al.* [26] who studied the ability of four cell walls, having different compositions on binding OTA, and reported that

there were no changes in the amount of OTA adsorbed. The mechanism of OTA elimination by binding with microorganisms is a rapid process. Indeed, it was found that a period of half an hour of contact between LAB cells and OTA was enough to remove more than 80% of the total OTA removed throughout the experiment that lasted 24h and no major changes were observed until the end of the experiment [27]. These observations were similar to those obtained by El-Nezami, *et al.* [28] who found that even at 0 min, 80% of the AFB1 was removed by two strains of *L. rhamnosus*. The binding mechanism of OTA with actinobacteria strains has not been yet elucidated. Nevertheless, it was thoroughly explained for Gram-positive bacteria, a group of which actinobacteria are a part of. In fact, Piotrowska [27] found that cells which had their cell wall partially removed, bound the OTA less than the non modified cells, which proves the implication of the cell walls in this type of detoxification. Moreover, *Escherichia coli*, Gram-negative bacteria, was found not able to bind toxins, that was attributed to its moderately hydrophilic surface (rich in lipopolysaccharides). While LAB bacteria have a similar wall composition, they have hydrophobic pockets on their wall surfaces that confers the bacteria the ability to bind OTA [29].

In this study we found that the supernatant of each of the tested strains had a slight but significant effect on OTA reduction in ISP2 liquid medium after 5 days of incubation. Reduction levels were even higher when the strains were cultured in ISP2 liquid medium contaminated with 95.45 ng/mL of OTA. Indeed, AT8 supernatant was capable of degrading 22.42% of the OTA, while the strain itself reduced 42.13% of the added OTA. Some authors assumed that biodegradation of OTA is also involved in the food detoxification process. Viable *L. acidophilus* cells were able to reduce OTA (95% after 4h) more efficiently than non viable cells [30]. Similarly, *S. cerevisiae* was able to degrade 38% of this toxin after 24h, without any descriptions on the type of the resulting metabolites [10]. Schatzmayr, *et al.* [31] explained this process when he noticed that *Trichosporum*, *Rhodotorula* and *Cryptococcus* strains biodegraded OTA through the hydrolysis of the amide bond, resulting in OT α and L- β -phenylalanine accumulation. This type of degradation mechanism can be adopted in detoxification techniques, since both of the resulting metabolites are virtually non-toxic. Other studies suggested that biodegradation can be achieved via the cleavage of the lactone ring, resulting in the formation of an opened lactone form of OTA that exhibited similar toxicity of OTA in rats [9].

In the third part of this study, results showed that MS1, G10 and ML5 strains had a significant impact on the expression of *acpkS*, *acOTApks* and *acOTAnrps* in *A. carbonarius* S402, that eventually resulted in the reduction of OTA production by 23.91, 13.50 and 11.69 respectively for each strain, whereas the coculture of *A. carbonarius* S402 with the other 4 strains (AT10, AT8, PT1 and SN7) did not affect the expression of these genes. This type of mode of action was studied by Verheecke, *et al.* [32] on *A. flavus* and *A. parasiticus* and found that some actinobacteria strains (S27 and S17) did not significantly affect the expression of AFB biosynthetic genes, while others (S06, S13 and S35) had a great impact on several genes (S06 down-regulated *aflS* expression by 100%).

This study showed that the application of different actinobacteria strains might reduce the OTA contamination, since each strain acted differently when it was put in contact with this toxin. OTA detoxification (binding and biodegradation) with actinobacteria strains might be more effective than preventing the production of this toxin. Further studies are required on this topic, in order to evaluate the effect of the studied bacteria on the integrity of the decontaminated food.

4. Materials and methods

4.1. Actinobacteria and *A. carbonarius* strains

Several actinobacteria strains, previously isolated from Algerian soils were chosen for our study. In order to revive these strains (AT10, AT8, SN7, MS1, ML5, G10 and PT1), they were first sub-cultured for 4 days at 28°C, on an ISP2 (International Streptomyces Project 2) agar medium (4.0g yeast extract, 10.0g malt extract, 4.0g dextrose, 20.0g agar, 1L tap water, pH adjusted to 7.2). In parallel, *A. carbonarius* spores solution was prepared in the same manner described in our previous work [8]. The spores count

was evaluated with a Neubauer haemocytometer (Superior, Marienfield, Lauda-Konigshofen, Germany); the concentration was adjusted to 10^6 spores/ml and kept at 4 °C before use.

4.2. Preparation of Ochratoxin A contaminated PBS

The OTA standard (Supelco, 595 North Harrison Road, Bellefonte, PA) was suspended in acetonitrile (Sigma-Aldrich, 3050 Spruce Street, St. Louis, USA) in order to prepare a stock solution of 3.0 µg/mL. Afterwards, a working solution of 95.45 ng/mL was prepared by diluting the stock solution with PBS. In order to evaporate the non aqueous phase, an evaporation step at 45 °C with nitrogen is essential at this point in order to dissolve the OTA droplets in PBS. This solution was later used for binding and detoxification assays.

4.2. Binding Essay

4.2.1. Preparation of actinobacteria suspension

Each strain of actinobacteria was cultured in 20 mL of liquid ISP2 medium for 5 days at 28 °C in a shaker/incubator (Model SI-45, serial number AS-SI45-1038E). The bacterial solution was prepared by filtering the cultures through Sartorius 150 mm filters (grade 290, particles retention size 80µm², Sartorius filter discs, AG-37070 Goettingen, Germany) (the filtrated ISP2 medium was kept for further use). The filters were then placed in sterile pots containing each 10 mL of sterile water. The pots were vigorously shaken to separate the actinobacteria from the filters. The bacterial solution was directly used for the binding tests.

4.2.2. OTA Binding Kinetics

In 2 mL tubes, 1 mL of the OTA contaminated PBS was added to 1 mL of bacterial suspension (OTA final concentration of 45.12 ng/mL). At 0, 30 and 60 minutes, tubes were centrifuged and 1 mL of the supernatant was purified with Ochraprep Immunoaffinity columns and quantified with HPLC. As for the pellets, they were washed with methanol acidified with acetic acid (98:2 v/v), purified with Ochraprep Immunoaffinity columns (R-Biopharm, Glasgow, Scotland) and quantified with HPLC.

4.3. Detoxification activity of the actinobacteria

The spores of the *actinobacteria* strains were scrapped from the pre-culture surfaces and added each to 20 mL of liquid ISP2 medium, artificially contaminated with OTA solution. The total concentration of OTA was adjusted in order to have 95.45 ng/mL of OTA for each condition. The cultures were held in a shaker/incubator (Model SI-45, serial number AS-SI45-1038E) at 28 °C for 5 days with a constant shaking speed of 250 rpm. After the incubation period, the culture tubes were shaken and then centrifuged at 13000 r.p.m. A volume of 1 mL of the supernatant was removed and purified with Ochraprep Immunoaffinity columns (R-Biopharm, Glasgow, Scotland) following the manufacturer protocol, and analyzed by HPLC.

In order to evaluate the strains capacity on OTA detoxification, we proceeded to follow the previously described protocol. However, the OTA contaminated ISP2 medium was inoculated with the supernatants of the studied actinobacteria instead of the bacterial solutions.

4.4. Coculture of *A. carbonarius* and actinobacteria study

Each of the studied *actinobacteria* strains was co-cultured with *A. carbonarius* in Potato Dextrose Agar medium (PDA) (Biolife, Italiana S.R.L, viale Monza, Milano, Italy) by placing two parallel lines, each at 2 cm away from the center of the Petri dishes (Figure 1). The center of the medium was inoculated with 10^6 spores of *A. carbonarius* S402. The cultures were then held at 28°C for 5 days.

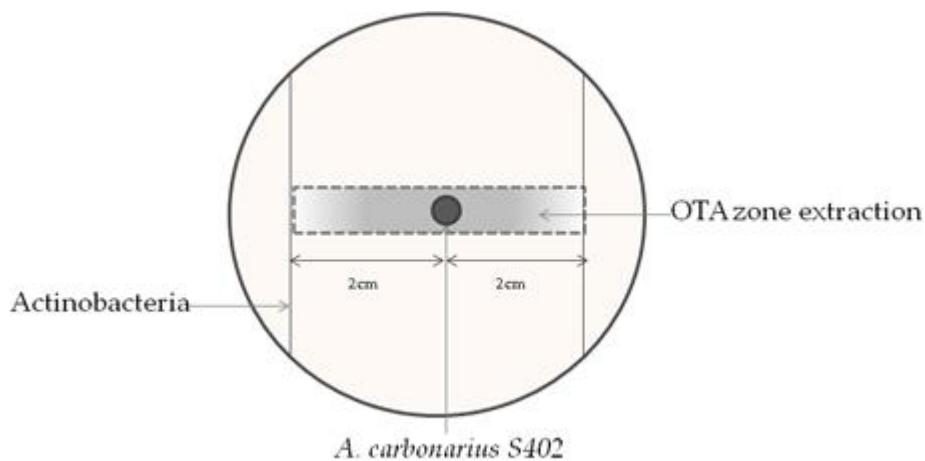


Figure 1. Schematic representation of actinobacteria and *A. carbonarius* S402 cocultures on Potato Dextrose Agar (PDA) for 5 days at 28 °C.

4.4.1. Effect on Growth of *A. carbonarius*

In order to evaluate the dry fungal weight, a sterilized transparent cellophane film was placed on the surface of PDA medium, prior its inoculation with *A. carbonarius* and the actinobacteria strains. After the coculture period, the antifungal activities of each actinobacteria strain was evaluated by measuring the radial growth (cm) and the dry weight (g) of *A. carbonarius* S402, both after 5 days of culture. *A. carbonarius* S402 dry weight was evaluated by cutting the cellophane film around the fungus and weighing the mycelium after its desiccation (placing the transparent film carrying the culture at 100 °C for 24h). As for the radial growth, diameters measurements of *A. carbonarius* cultures were taken after 5 days of incubation at 28 °C.

All essays were carried out in triplicate for each coculture condition.

4.4.2. Total RNA extraction, cDNA synthesis and qRT-PCR for gene expression analysis

Coculture conditions of *A. carbonarius* S402 and actinobacteria were the same as described previously. After the culture period, the mycelium was cut carefully from the rest of the cellophane film and ground into fine powder with liquid nitrogen. The total RNA was then extracted from the powder using RNeasy kit (Qiagen, Düsseldorf, Germany) following the manufacturer protocol. The RNA was then treated with DNase I Amplification Grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Before performing cDNA synthesis, the quantity and integrity of the extracted RNA were evaluated using Experion RNA analysis kit and software (version 3.20, 2015, BioRad, Marnes-la-Coquette, France). The synthesis of the single strand cDNA was performed starting with 1 µg of total RNA using Advantage RT-for-PCR kit with both oligo (dT) and random hexamer following the manufacturer protocol (Clontech, Mountain View, CA, USA).

As for the qRT-PCR analysis, the expression of the targeted genes (*acpk*, *acOTApk*, *acOTAnrps*, *laeA* and *veA*) was evaluated with CFX96 Touch Real Time PCR detection system BioRad (version 3.0, 2012), using SsoAdvanced Universal Sybr Green Supermix (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), starting with 100 ng/µL of the synthesized cDNA and following the manufacturer protocol for the mix preparation and amplification cycles. The Tm (melting temperature) was optimized and used at 58 °C. The reference gene, β -tubulin, was chosen based on our previous study [8]. The efficiencies of the primers (Table 5) were determined by a series of cDNA dilutions, and were calculated from the slopes of the obtained curves.

Table 5: List of primers used in this study

| Primer name | Primer sequence (5' – 3') | References | Efficiency |
|--------------------|---------------------------|------------|------------|
| <i>acpkS-F</i> | GAGTCTGACCACATCGACACGG | [33] | 95.0% |
| <i>acpkS-R</i> | GGCGACTGTGACACATCCAT | | |
| <i>acOTApks-F</i> | CGTGTCCGATACTGTCTGTGA | [34] | 98.5% |
| <i>acOTApks-R</i> | GCATGGAGTCCTCAAGAACCC | | |
| <i>acOTAnrps-F</i> | ATCCCCGAATATTGGCACCC | [35] | 102.1% |
| <i>acOTAnrps-R</i> | CCTTCGATCAAGAGCTCCCC | | |
| <i>laeA-F</i> | CACCTATACAACCTCCGAACC | [36] | 100.7% |
| <i>laeA-R</i> | GGTTCGGCCAACCGACGACGC | | |
| <i>veA-F</i> | TCCCGGTTCTCACAGGGCGTA | [36] | 99.3% |
| <i>veA-R</i> | GCTGTCCCTGGTCTCCTCGTA | | |
| <i>β-tubulin-F</i> | CGCATGAACGTCTACTTCAACG | [37] | 101.1% |
| <i>β-tubulin-R</i> | AGTTGTTACCAGCACCGGA | | |

4.5. OTA extraction

The OTA concentration was performed by extracting 3 agar plugs from the PDA medium, with 0.5 cm diameter each. OTA was extracted by adding 1 mL of methanol and shaken for 1 hour. After the incubation period, the mix was centrifuged at 13000 rpm (round per minute) for 20 minutes. The supernatant containing the OTA was then purified with Ochrarprep immunoaffinity columns (R-Biopharm, Glasgow, Scotland) following the manufacturer protocol.

4.6. HPLC analysis

The concentration of the purified OTA was evaluated with Water Alliance HPLC system using an Utisphere ODB column, C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm, 120 Å) (Interchim, Montluçon, France) at 30 °C. The isocratic flow (flow rate of 1 mL/min) was composed of 49% acidified water (0.2% of acetic acid) and 51% acetonitrile for 30 min of run. The volume of the injected extract was set at 100 µL and OTA was detected after 8 minutes of run, by a fluorescent detector at 333/440 nm excitation/emission wavelengths.

4.7. Statistical analysis

All the data in this study were analyzed through One-Way Analysis Of Variance (ANOVA) and paired t-test using STATGRAPHICS Centurion XVI (version 16.1.11 for windows, 2010, StatPoint Technologies Inc. Warrenton, VA, USA).

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

List of Abbreviations

A. carbonarius: *Aspergillus carbonarius*

qRT-PCR : Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

OTA: Ochratoxin A

LAB: Lactic Acid Bacteria

AFB: Aflatoxin

PDA: Potato Dextrose Agar

ISP2: International *Streptomyces* Project-2

PBS: Phosphate Buffer Solution

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

rpm: Round per minute

References

1. Park, J.W.; Chung, S.-H.; Kim, Y.-B. Ochratoxin a in korean food commodities: Occurrence and safety evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53, 4637-4642.
2. Overy, D.P.; Seifert, K.A.; Savard, M.E.; Frisvad, J.C. Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts. *International journal of food microbiology* 2003, 88, 69-77.
3. Juodeikiene, G.; Bartkiene, E.; Basinskiene, L.; Matusevicius, P. Mycotoxin decontamination aspects in food, feed and renewables using fermentation processes. INTECH Open Access Publisher: 2012.
4. El Khoury, A.; Rizk, T.; Lteif, R.; Azouri, H.; Delia, M.-L.; Lebrihi, A. Occurrence of ochratoxin a- and aflatoxin b1-producing fungi in lebanese grapes and ochratoxin a content in musts and finished wines during 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54, 8977-8982.
5. IARC. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; World Health Organization: Lyon, France 1993, 56, 489-521.
6. Wu, F.; Bui-Klimke, T.; Naumoff Shields, K. Potential economic and health impacts of ochratoxin a regulatory standards. *World Mycotoxin Journal* 2014, 7, 387-398.
7. Hua, H.; Xing, F.; Selvaraj, J.N.; Wang, Y.; Zhao, Y.; Zhou, L.; Liu, X.; Liu, Y. Inhibitory effect of essential oils on aspergillus ochraceus growth and ochratoxin a production. *PloS one* 2014, 9, e108285.
8. Murthy, P.S.; Borse, B.B.; Khanum, H.; Srinivas, P. Inhibitory effects of ajowan (*trachyspermum ammi*) ethanolic extract on a. Ochraceus growth and ochratoxin production. *Turkish Journal of Biology* 2009, 33, 211-217.
9. El Khoury, R.; Atoui, A.; Verheecke, C.; Maroun, R.; El Khoury, A.; Mathieu, F. Essential oils modulate gene expression and ochratoxin a production in aspergillus carbonarius. *Toxins* 2016, 8.
10. Abrunhosa, L.; Paterson, R.R.; Venancio, A. Biodegradation of ochratoxin a for food and feed decontamination. *Toxins* 2010, 2, 1078-1099.
11. Böhm, J.; Grajewski, J.; Asperger, H.; Cecon, B.; Rabus, B.; Razzazi, E. Study on biodegradation of some a-and b-trichothecenes and ochratoxin a by use of probiotic microorganisms. *Mycotoxin research* 2000, 16, 70-74.
12. Bejaoui, H.; Mathieu, F.; Taillandier, P.; Lebrihi, A. Ochratoxin a removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological saccharomyces strains. *J Appl Microbiol* 2004, 97, 1038-1044.
13. Brady, D.; Stoll, A.; Starke, L.; Duncan, J. Chemical and enzymatic extraction of heavy metal binding polymers from isolated cell walls of saccharomyces cerevisiae. *Biotechnology and bioengineering* 1994, 44, 297-302.
14. Bolognani, F.; Rumney, C.; Rowland, I. Influence of carcinogen binding by lactic acid-producing bacteria on tissue distribution and in vivo mutagenicity of dietary carcinogens. *Food and Chemical Toxicology* 1997, 35, 535-545.
15. Santos, A.; Marquina, D.; Leal, J.; Peinado, J. (1 → 6)-β-d-glucan as cell wall receptor for pichia membranifaciens killer toxin. *Applied and environmental microbiology* 2000, 66, 1809-1813.
16. Bata, Á.; Lásztity, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science & Technology* 1999, 10, 223-228.
17. Patharajan, S.; Reddy, K.; Karthikeyan, V.; Spadaro, D.; Lore, A.; Gullino, M.; Garibaldi, A. Potential of yeast antagonists on invitro biodegradation of ochratoxin a. *Food Control* 2011, 22, 290-296.
18. Styriak, I.; Conková, E. Microbial binding and biodegradation of mycotoxins. *Veterinary and human toxicology* 2002, 44, 358-361.
19. Varga, J.; Péteri, Z.; Tábori, K.; Téren, J.; Vágvölgyi, C. Degradation of ochratoxin a and other mycotoxins by rhizopus isolates. *International journal of food microbiology* 2005, 99, 321-328.
20. Bielecki, S.; Tramper, J.; Polak, J. The biodegradation of ochratoxin a in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. *Food Biotechnology* 2000, 17, 307.
21. Turbic, A.; Ahokas, J.; Haskard, C. Selective in vitro binding of dietary mutagens, individually or in combination, by lactic acid bacteria. *Food additives & contaminants* 2002, 19, 144-152.
22. Ningthoujam, S.; Sanasam, S.; Tamreihao, K.; Nimaich, S. Antagonistic activities of local actinomycete isolates against rice fungal pathogens. *African journal of microbiology research* 2009, 3, 737-742.
23. Hogan, C.M. Bacteria. Encyclopedia of Earth. Washington DC: National Council for Science and the Environment 2010.

24. Verheecke, C.; Liboz, T.; Darriet, M.; Sabaou, N.; Mathieu, F. In vitro interaction of actinomycetes isolates with *aspergillus flavus*: Impact on aflatoxins b1 and b2 production. *Lett Appl Microbiol* 2014, 58, 597-603.
25. Piotrowska, M.; Zakowska, Z. The elimination of ochratoxin a by lactic acid bacteria strains. *Polish Journal of Microbiology* 2005, 54, 279-286.
26. Pereyra, C.M.; Cavaglieri, L.R.; Keller, K.M.; Maris, S.; Chiacchiera, C.A.d.R.R.; Dalcerio, A.M. In vitro ochratoxin a adsorption by commercial yeast cell walls. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 2015, 7(1):25-28.
27. Yiannikouris, A.; André, G.; Poughon, L.; François, J.; Dussap, C.-G.; Jeminet, G.; Bertin, G.; Jouany, J.-P. Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with β -d-glucans. *Biomacromolecules* 2006, 7, 1147-1155.
28. Piotrowska, M. The adsorption of ochratoxin a by lactobacillus species. *Toxins* 2014, 6, 2826-2839.
29. El-Nezami, H.; Kankaanpaa, P.; Salminen, S.; Ahokas, J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin b 1. *Food and Chemical Toxicology* 1998, 36, 321-326.
30. Haskard, C.A.; El-Nezami, H.S.; Kankaanpää, P.E.; Salminen, S.; Ahokas, J.T. Surface binding of aflatoxin b1 by lactic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology* 2001, 67, 3086-3091.
31. Fuchs, S.; Sontag, G.; Stidl, R.; Ehrlich, V.; Kundi, M.; Knasmüller, S. Detoxification of patulin and ochratoxin a, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology* 2008, 46, 1398-1407.
32. Schatzmayr, G.; Heidler, D.; Fuchs, E.; Nitsch, S.; Mohnl, M.; Täubel, M.; Loibner, A.; Braun, R.; Binder, E. Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxin a. *Mycotoxin research* 2003, 19, 124-128.
33. Verheecke, C.; Liboz, T.; Anson, P.; Diaz, R.; Mathieu, F. Reduction of aflatoxin production by *aspergillus flavus* and *aspergillus parasiticus* in interaction with streptomycetes. *Microbiology* 2015, 161, 967-972.
34. Gallo, A.; Perrone, G.; Solfrizzo, M.; Epifani, F.; Abbas, A.; Dobson, A.D.; Mule, G. Characterisation of a pks gene which is expressed during ochratoxin a production by *aspergillus carbonarius*. *International journal of food microbiology* 2009, 129, 8-15.
35. Gallo, A.; Knox, B.P.; Bruno, K.S.; Solfrizzo, M.; Baker, S.E.; Perrone, G. Identification and characterization of the polyketide synthase involved in ochratoxin a biosynthesis in *aspergillus carbonarius*. *International journal of food microbiology* 2014, 179, 10-17.
36. Gallo, A.; Bruno, K.S.; Solfrizzo, M.; Perrone, G.; Mule, G.; Visconti, A.; Baker, S.E. New insight into the ochratoxin a biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *aspergillus carbonarius*. *Appl Environ Microbiol* 2012, 78, 8208-8218.
37. Crespo-Sempere, A.; Marin, S.; Sanchis, V.; Ramos, A.J. Vea and laea transcriptional factors regulate ochratoxin a biosynthesis in *aspergillus carbonarius*. *International journal of food microbiology* 2013, 166, 479-486.
38. Cabañes, F.J.; Bragulat, M.R.; Castellá, G. Characterization of nonochratoxigenic strains of *aspergillus carbonarius* from grapes. *Food Microbiology* 2013, 36, 135-141.



© 2017 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

III. Conclusion

En conclusion, la réduction de l'OTA peut être achevée soit en employant des agents antioxydants, soit en réduisant sa disponibilité par des méthodes enzymatiques ou d'adhésion. Notre étude a montré que l'emploi des souches

d'actinomycètes, pourra effectivement conduire à la réduction des taux d'OTA selon la nature de la souche.

En effet, les souches MS1, ML5 et G10 ont pu réprimer l'expression des gènes de biosynthèse (*acpk*s, *acOTApk*s et *acOTAnrp*s) induisant ainsi à une inhibition de la production de l'OTA par *A. carbonarius* S402. La souche ML5 était la plus efficace, puisqu'elle a inhibé l'expression du gène *acpk*s de 39%, le fait qui a entraîné une baisse de 13.70% de la production de l'OTA.

Pourtant cette souche n'était pas parmi les souches les plus puissantes qui ont pu adhérer l'OTA à leur surface.

La souche SN7 avait l'effet la plus remarquable. En effet, elle a inhibé jusqu'à 33.93% de l'OTA présent dans la solution PBS. En plus, cette même souche a pu dégrader significativement l'OTA après 5 jours d'incubation dans le milieu PDA, réduisant ainsi 52.68% de l'OTA préalablement ajoutée au milieu de culture.

Discussion générale et perspectives

Les composés phénoliques et les huiles essentielles extraits des feuilles, des tiges, des racines ainsi que des grains des plantes possèdent un large spectre d'activité biologique et peuvent fournir des alternatives potentielles aux fongicides toxiques actuellement utilisés pour contrôler la croissance des champignons avant et après la récolte.

Effectivement la première partie de notre étude a montré que l'emploi de ces deux types d'extraits a contribué d'une part à la réduction de la croissance fongique, observée uniquement avec l'emploi des huiles essentielles (huiles essentielles du thym, cannelle, taramira et origan) et d'autre part à l'inhibition de la production de l'OTA, sans forcément touché à la croissance fongique. Ce type de réduction a été obtenu en utilisant les composés phénoliques et les huiles essentielles des plantes suivantes : fenouil, céleri, cardamome, camomille, anis, romarin, feuille de laurier, cumin, fenugrec, mélisse, menthe et sauge. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par d'autres auteurs, qui ont évalué l'effet de divers extraits végétaux sur la croissance des champignons mycotoxinogènes et leur capacité à produire les mycotoxines propre à chaque espèce étudiée (Basílico and Basílico, 1999, Boutigny *et al.*, 2009, Cakir *et al.*, 2005, da Cruz Cabral *et al.*, 2013, Ferreira *et al.*, 2013, Fuchs *et al.*, 2008).

Des études approfondies ont expliqué le mode d'action des huiles essentielles sur les champignons et bien d'autres microorganismes. En effet, les propriétés antifongiques de ces huiles dépendent principalement des caractéristiques quantitatives et qualitatives de leurs composants actifs (Ibrahim *et al.*, 2015). Des groupes fonctionnels tels que l'alcool, les phénols, les terpènes et les cétones ainsi que l'existence d'une certaine corrélation synergique entre les composants totaux. En plus, leur amphipathie leur amène à interagir avec la biomembrane et montrer une activité microbienne (Veldhuizen *et al.*, 2006, Tripathi *et al.*, 2009). Le mécanisme est attribué au noyau benzénique hydrophobe et aux chaînes latérales aliphatiques enfouies dans la partie hydrophobe interne de la membrane, ainsi que la partie hydrophile de la molécule qui interagit avec la partie polaire de la membrane. Une autre explication est

basée sur l'implication du groupe hydroxyle dans la formation des liaisons hydrogène et l'acidité de ces composés phénoliques (Cristani *et al.*, 2007).

D'autres auteurs ont mis une hypothèse qui atteste que les effets antifongiques des huiles essentielles reviennent à leur toxicité sur la fonctionnalité et la structure de la membrane cellulaire, en inhibant la respiration et la perméabilité de la membrane du champignon (Sikkema *et al.*, 1995). A des doses plus élevées, ces huiles provoquent des dommages cellulaires irréversibles à cette membrane conduisant ainsi à la perte de l'homéostasie et la mort cellulaire (Carson *et al.*, 2002). Conner and Beuchat (1984) ont attribué l'effet antifongique des huiles essentielles aux interactions de ces dernières avec les enzymes cellulaires impliquées dans la production d'énergie et la synthèse des composants structurels des cellules microbiennes.

D'un autre point de vue, Omidbeygi *et al.* (2007) ont suggéré que les composants des huiles essentielles pénètrent dans la membrane cellulaire et interagissent avec les protéines de la membrane, conduisant à un flux de protons vers l'extérieur de la cellule, le fait qui provoque la mort cellulaire. D'une autre part, il a été indiqué par Lucini *et al.* (2006) que les monoterpènes présents dans les huiles essentielles provoquent l'inhibition de la croissance du mycélium en augmentant la concentration des peroxydes lipidiques tels que les radicaux hydroxyles, alkoxyde et alkperoxyde, activant ainsi la voie de l'apoptose cellulaire.

Un autre mode d'action des huiles essentielles a été récemment mis en évidence pour les huiles n'ayant pas un effet sur la croissance du champignon producteur de mycotoxine mais plutôt sur la production des ces toxines. Plusieurs auteurs ont remarqué que l'emploi des huiles essentielles ou de leurs composants actifs, a inhibé la production de l'OTA et que cette réduction n'était pas en corrélation avec la réduction de la masse fongique (Murthy *et al.*, 2009, Hua *et al.*, 2014, Ferrara *et al.*, 2015). Cette diminution de la production a été attribuée à la répression de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de cette toxine. Ces observations sont

similaires à celles obtenues et élaborées dans le deuxième chapitre de cette étude. Effectivement, les huiles essentielles du fenouil, cardamome, camomille, romarin, anis et céleri ont réduit la production de l'OTA en réduisant l'expression des gènes *acpk*s, *acOTApks*, *acOTAnrps* ainsi que les gènes de régulation *veA* et *laeA*.

La détoxification des mycotoxines est achevée par l'élimination, l'inactivation ou la dégradation des mycotoxines présentes dans les commodités contaminées (Kabak *et al.*, 2006). Ces dernières années ont témoignées l'intérêt croissant pour détoxifier l'OTA par des microorganismes, tels que les bactéries, les levures et les champignons. Effectivement, la dégradation de l'OTA par divers microorganismes a été élaborée par plusieurs auteurs au cours des années. Özpinar *et al.* (1999) ont découvert que les microorganismes présents dans le rumen, surtout les protozoaires, hydrolysent l'OTA en OT α , un métabolite dont sa toxicité est inférieure à celle de l'OTA. D'autres études ont montré la capacité de différents microorganismes à dégrader l'OTA, tels que *Phenylobacterium immobile* (Wegst and Lingens, 1983), *Acinobacter calcoaticus* (Hwanga and Draughon, 1994), *Trichosporon mycotoxinivorans* (Schatzmayr *et al.*, 2006), *brevibacterium* spp. (Rodriguez *et al.*, 2011), *Pediococcus parvulus* (Abrunhosa *et al.*, 2014), *Aspergillus* spp. (Varga *et al.*, 2000) ainsi que les bactéries lactiques. L'étude de la dégradation de l'OTA a été poursuivie sur des bactéries lactiques appartenant généralement au genre *Lactobacillus* vue leurs effets bénéfiques et leurs propriétés probiotiques (Naidu *et al.*, 1999). Effectivement, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. sanfranciscensis* et *L. rhamnosus* sont les bactéries lactiques les plus efficaces contre la décontamination de l'OTA par dégradation enzymatique après 40h de contact (70.5, 67.1, 52.0 et 87.5% respectivement pour ces souches) (Piotrowska and Zakowska, 2005).

Nos résultats sont similaires à ceux trouvés dans la littérature, puisque les tests ont montré qu'en présence des surnageant des sept souches d'actinomycètes, les taux d'OTA ont diminué significativement, tout en dépendant de la souche utilisée. C'est ainsi que le surnageant de la souche SN7 a réduit 22.46% l'OTA (taux de réduction le

plus élevé), le fait qui signifie que la bactérie a produit naturellement des enzymes capables de cliver l'OTA et diminuer par la suite sa disponibilité. Cependant, la culture de la souche SN7 en présence de l'OTA a diminué d'avantage ce taux, arrivant à 52.68% pour cette souche. L'activité enzymatiques des bactéries issues du sol contre l'OTA a été évalué par De Bellis *et al.* (2015) qui ont trouvé que *Acinetobacter calcoaceticus* 396.1 et *Acinetobacter* sp. neg1 (isolées du sol des vignobles) ont pu transformer l'OTA en OT α après 5 jours de culture sur le milieu de culture BHI (Brain Heart Infusion broth). Egalement, d'autres rapports ont montré que les bactéries isolées des sols agricoles représentent une source intéressante de microorganismes ayant la capacité de dégrader les mycotoxines (Islam *et al.*, 2012, Sato *et al.*, 2012). En effet, les bactéries du sol, telles que *Pseudomonas* spp. et *Acinetobacter* spp. sont capables de convertir un important nombre de composés aromatiques, jouant ainsi un rôle primordiale dans la biodégradation des molécules toxiques présentes dans les sols contaminés (Cao *et al.*, 2009). Les souches d'actinomycètes décrites dans cette étude peuvent avoir la même voie de dégradation reconnue chez d'autres microorganismes (Abrunhosa *et al.*, 2010), en dégradant l'OTA par l'hydrolyse de la liaison amide, provoquant ainsi la libération de l'OT α , considéré comme non toxique (Xiao *et al.*, 1995, Bittner *et al.*, 2015). Plusieurs peptidases sont impliquées dans cette catalyse, telle que l'enzyme carboxypeptidase A isolée du pancréas bovin (Doster and Sinnhuber, 1972), une enzyme du type lipase disponible dans le commerce (Stander *et al.*, 2001), une enzyme protéique isolée d'*A. niger* (Abrunhosa *et al.*, 2006) ainsi que la carboxypeptidase Y isolée de *S. cerevisiae* (Abrunhosa *et al.*, 2010).

Les différences entre les taux de réductions de l'OTA entre les surnageants de bactéries et les bactéries mêmes après 5 jours de culture dans le milieu ISP2 liquide, nous a poussés à examiner le pouvoir d'adhésion des sept souches utilisées. La confirmation de cette hypothèse a été exécutée suite à une cinétique entre les souches de bactéries et l'OTA mises en contact dans une solution non nutritive (PBS). Après une heure d'incubation, le taux d'OTA a diminué d'une manière significative par

toutes les souches. La souche SN7 avait le pouvoir d'adhésion le plus fort, puisqu'après 60 mins, elle a pu adhérer 33.93% de l'OTA à sa surface. Cette quantité a été relarguée après le lavage du culot bactérien par une solution de méthanol acidifiée (2% acide acétique). En effet, *L. acidophilus* VM20, *L. plantarum*, *L. brevi* and *L. sanfranciscensis* ont provoqué une diminution dans les taux d'OTA variant entre 14.8% (*L. sanfranciscensis*) et 95% (*L. acidophilus* VM20) dans la solution non nutritive PBS (Petchkongkaew *et al.*, 2008, Piotrowska, 2014). Ces résultats sont similaires aux nôtres, comme toutes les actinobactéries testées ont pu réduire significativement l'OTA ajoutée à la solution PBS. En 2014, Piotrowska (2014) ont observé que le temps d'adhésion de l'OTA à la surface des bactéries lactiques est un processus très rapide (85% de l'OTA a été réduite après 30 minutes de contact). Similairement, les résultats de notre étude montrent que la souche SN7 a pu adhérer 33.93% de l'OTA après 60 minutes, sachant que même après 5 jours de culture ce taux a atteint 36.60% (augmentation de 2.67% seulement). Selon la littérature, la liaison des mycotoxines aux biomasses bactériennes se fait par le biais des composants de la paroi cellulaire, puisque les bactéries dépourvues de cette paroi perdent leur capacité à adhérer les mycotoxines. Les composants impliqués dans ce processus sont les peptidoglycanes et les polysaccharides ainsi que les acides teichoïques et lipoteichoïques (Zhang and Ohta, 1991, Niderkorn *et al.*, 2009). Le facteur principal responsable de l'élimination des toxines revient probablement à la nature hydrophobe de la paroi cellulaire bactérienne (Haskard *et al.*, 2001, Haskard *et al.*, 2000).

Les huiles essentielles sont des extraits complexes, constitués de plusieurs composés pouvant déclencher une réponse cellulaire et des modifications au niveau transcriptomique qui peuvent ne pas être forcément liés à son effet antiochratoxinogène. La purification d'un ou de plusieurs composants actifs des huiles possédant ce pouvoir, pourra être une piste intéressante afin de lutter contre l'OTA, et d'évaluer leur possibilité d'application aux champs et dans les silos de stockage ainsi que sur des denrées alimentaires.

Le but de notre projet est de se débarrasser de l'OTA afin de limiter les pertes économiques ainsi que les dégâts sanitaires causés par cette toxine. Afin de respecter ce but, nous souhaitons étudier l'effet des huiles essentielles, des composés phénoliques ainsi que les actinobactéries sur la santé de l'homme d'une part et la qualité organoleptique du produit traité d'une autre part.

La troisième partie de notre étude qui portait sur la détoxification de l'OTA a été réalisée en utilisant sept souches d'actinomycètes. Pour compléter cette étude, il sera bien convenable de continuer de travailler sur d'autres souches d'actinomycètes afin de trouver une ou plusieurs souches ayant un potentiel réducteur intéressant de l'OTA.

Il est généralement préférable d'éliminer l'OTA par adhésion que par dégradation enzymatique, vu l'absence de l'apparition des métabolites de dégradation. Pour cette raison, une étude approfondie sur l'optimisation de la capacité d'adhésion des souches d'actinomycètes est souhaitée, en travaillant sur l'augmentation des sites d'adhésion propre à chaque souche par divers techniques physiques et/ou chimiques.

- ABARCA, M. L. B., M.R.; CASTELLA, G.; CABANES, F.J. (1994). OchratoxinA production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2650-2652.
- ABBAS, A., COGLIANI, A., O'CALLAGHAN, J., GARCIA-ESTRADA, C., MARTIN, J. F. and DOBSON, A. D. (2013). Functional characterization of the polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Penicillium verrucosum*. *International journal of food microbiology*, 161, 172-81.
- ABRUNHOSA, L., INÊS, A., RODRIGUES, A. I., GUIMARÃES, A., PEREIRA, V. L., PARPOT, P., MENDES-FAIA, A. and VENÂNCIO, A. (2014). Biodegradation of ochratoxin A by *Pediococcus parvulus* isolated from Douro wines. *International journal of food microbiology*, 188, 45-52.
- ABRUNHOSA, L., PATERSON, R. R. and VENANCIO, A. (2010). Biodegradation of ochratoxin a for food and feed decontamination. *Toxins*, 2, 1078-99.
- ABRUNHOSA, L., SANTOS, L. and VENÂNCIO, A. (2006). Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. *Food Biotechnology*, 20, 231-242.
- AFSSA (2009). Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale-Rapport final.
- AKUECHE, E., ANJORIN, S., HARCOURT, B., KANA, D., ADEBOYE, E., SHEHU, I., AKANDE, R., ADELEKE, A., SHONOWO, O. and ADESANMI, C. (2012). Studies on fungal load, total aflatoxins and ochratoxin A contents of gamma-irradiated and non-irradiated *Sesamum indicum* grains from Abuja markets, Nigeria. *Kasetsart J Nat Sci*, 46, 371-82.
- ALDERMAN, S. C., COATS, D. D., CROWE, F. J. and BUTLER, M. D. (1998). Occurrence and distribution of ergot and estimates of seed loss in Kentucky bluegrass grown for seed in central Oregon. *Plant Disease*, 82, 89-93.
- AMÉZQUETA, S., GONZÁLEZ-PEÑAS, E., MURILLO-ARBIZU, M. and LÓPEZ DE CERAIN, A. (2009). Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control*, 20, 326-333.
- AMOUTZIAS, G. D., VAN DE PEER, Y. and MOSSIALOS, D. (2008). Evolution and taxonomic distribution of nonribosomal peptide and polyketide synthases. *Future microbiology*, 3, 361-370.
- ANGIONI, A., CABONI, P., GARAU, A., FARRIS, A., ORRO, D., BUDRONI, M. and CABRAS, P. (2007). In vitro interaction between ochratoxin A and different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2043-2048.
- ARUNACHALAM, C. and DOOHAN, F. M. (2013). Trichothecene toxicity in eukaryotes: Cellular and molecular mechanisms in plants and animals. *Toxicology letters*, 217, 149-158.
- ASHIQ, S. (2015). Natural occurrence of mycotoxins in food and feed: Pakistan perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, 159-175.
- ASSANTE, G., LOCCI, R., CAMARDA, L., MERLINI, L. and NASINI, G. (1977). Screening of the genus *Cercospora* for secondary metabolites. *Phytochemistry*, 16, 243-247.
- AYDOGDU, H. and GUCER, Y. (2009). Microfungi and mycotoxins of grapes and grape products. *Trakia J Sci*, 7, 211-214.
- AZIZ, N. and MOUSSA, L. (1997). Influence of white light, near - UV irradiation and other environmental conditions on production of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus* and ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. *Food/Nahrung*, 41, 150-154.
- AZIZ, N. H., MOUSSA, L. A. and FAR, F. M. (2004). Reduction of fungi and mycotoxins formation in seeds by gamma - radiation. *Journal of food safety*, 24, 109-127.
- BACHA, N., ATOUI, A., MATHIEU, F., LIBOZ, T. and LEBRIHI, A. (2009). *Aspergillus westerdijkiae* polyketide synthase gene "aoks1" is involved in the biosynthesis of ochratoxin A. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 77-84.
- BACHA, N., MATHIEU, F., LIBOZ, T. and LEBRIHI, A. (2012). Polyketide synthase gene aolc35-12 controls the differential expression of ochratoxin a gene aoks1 in *Aspergillus westerdijkiae*. *World Mycotoxin Journal*, 5, 177-186.
- BACON, C. W., LYONS, P. C., PORTER, J. K. and ROBBINS, J. D. (1986). Ergot toxicity from endophyte-infected grasses: a review. *Agronomy journal*, 78, 106-116.

- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D. and IDAOMAR, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.
- BARBERIS, C., ASTORECA, A., FERNANDEZ-JURI, M. G., DALCERO, A. M. and MAGNOLI, C. (2010). Effect of antioxidant mixtures on growth and ochratoxin A production of Aspergillus section Nigri species under different water activity conditions on peanut meal extract agar. *Toxins*, 2, 1399-1413.
- BARBOSA, T. S., PEREYRA, C. M., SOLEIRO, C. A., DIAS, E. O., OLIVEIRA, A. A., KELLER, K. M., SILVA, P. P., CAVAGLIERI, L. R. and ROSA, C. A. (2013). Mycobiota and mycotoxins present in finished fish feeds from farms in the Rio de Janeiro State, Brazil. *International Aquatic Research*, 5, 1-9.
- BARRETT-BEE, K. and DIXON, G. (1994). Ergosterol biosynthesis inhibition: a target for antifungal agents. *Acta Biochimica Polonica*, 42, 465-479.
- BASÍLICO, M. Z. and BASÍLICO, J. C. (1999). Inhibitory effects of some spice essential oils on Aspergillus ochraceus NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 238-241.
- BATTILANI, P., BARBANO, C., MARIN, S., SANCHIS, V., KOZAKIEWICZ, Z. and MAGAN, N. (2006a). Mapping of Aspergillus section Nigri in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. *International journal of food microbiology*, 111, S72-S82.
- BATTILANI, P., MAGAN, N. and LOGRIECO, A. (2006b). European research on ochratoxin A in grapes and wine. *International journal of food microbiology*, 111, Supplement 1, S2-S4.
- BATTILANI, P., PIETRI, A., BERTUZZI, T., LANGUASCO, L., GIORNI, P. and KOZAKIEWICZ, Z. (2003). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection*®, 66, 633-636.
- BAYDAR, H., SAĞDIÇ, O., ÖZKAN, G. and KARADOĞAN, T. (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymbra and Satureja species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, 15, 169-172.
- BAYMAN, P. B., J.L.; DOSTER, M.A.; MICHAELIDES, T.J.; MAHONEY, N.E. (2002). Ochratoxin production by *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2326-2329.
- BAYRAM, Ö. and BRAUS, G. H. (2012). Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS microbiology reviews*, 36, 1-24.
- BAYRAM, Ö., KRAPPMANN, S., NI, M., BOK, J. W., HELMSTAEDT, K., VALERIUS, O., BRAUS-STROMEYER, S., KWON, N. J., KELLER, N. P., YU, J. H. and BRAUS, G. H. (2008). VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science*, 320, 1504-6.
- BEJAOUI, H., MATHIEU, F., TAILLANDIER, P. and LEBRIHI, A. (2004). Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *J Appl Microbiol*, 97, 1038-44.
- BELLI, N., MARIN, S., ARGILES, E., RAMOS, A. J. and SANCHIS, V. (2007). Effect of chemical treatments on ochratoxigenic fungi and common mycobiota of grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Food Protection*®, 70, 157-163.
- BENNETT, J. W. and KLICH, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497-516.
- BEVILACQUA, A., PETRUZZI, L., CORBO, M. R., BAIANO, A., GAROFALO, C. and SINIGAGLIA, M. (2014). Ochratoxin A released back into the medium by *Saccharomyces cerevisiae* as a function of the strain, washing medium and fermentative conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 3291-3295.
- BHATNAGAR, D., EHRLICH, K. and CLEVELAND, T. (2003). Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied microbiology and biotechnology*, 61, 83-93.
- BITTNER, A., CRAMER, B., HARRER, H. and HUMPF, H.-U. (2015). Structure elucidation and in vitro cytotoxicity of ochratoxin α amide, a new degradation product of ochratoxin A. *Mycotoxin research*, 31, 83-90.

- BIZAJ, E., MAVRI, J., CUS, F. and RASPOR, A. (2009). Removal of ochratoxin A in *Saccharomyces cerevisiae* liquid cultures. *SAfr J Enol Vitic*, 30, 151-155.
- BLAIR, D. (1989). Uncertainties in Pesticide Risk Estimation and Consumer Concern. *Nutrition Today*, 24, 13-19.
- BLEVE, G., GRIECO, F., COZZI, G., LOGRIECO, A. and VISCONTI, A. (2006). Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International journal of food microbiology*, 108, 204-209.
- BOERMANS, H. J. and LEUNG, M. C. (2007). Mycotoxins and the pet food industry: toxicological evidence and risk assessment. *International journal of food microbiology*, 119, 95-102.
- BOK, J. W. and KELLER, N. P. (2004). LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic cell*, 3, 527-535.
- BOUDRA, H. (2002). La contamination par les moisissures et les mycotoxines des fourrages conservés : signification et prévention. *Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)*, 60-62.
- BOUDRA, H., LE BARS, P. and LE BARS, J. (1995). Thermostability of Ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and environmental microbiology*, 61, 1156-1158.
- BOUTIGNY, A. L., BARREAU, C., ATANASOVA-PENICHON, V., VERDAL-BONNIN, M. N., PINSON-GADAIIS, L. and RICHARD-FORGET, F. (2009). Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycol Res*, 113, 746-53.
- BREDENKAMP, M. W., DILLEN, J. L., VAN ROOYEN, P. H. and STEYN, P. S. (1989). Crystal structures and conformational analysis of ochratoxin A and B: Probing the chemical structure causing toxicity. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1835-1839.
- BROWN, M., SZCZECH, G. M. and PURMALIS, B. (1976). Teratogenic and toxic effects of ochratoxin A in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 37, 331-338.
- BRUININK, A., RASONYI, T. and SIDLER, C. (1998). Differences in neurotoxic effects of ochratoxin A, ochracin and ochratoxin - α in vitro. *Natural toxins*, 6, 173-177.
- BRUL, S. and KLIS, F. M. (1999). Mechanistic and mathematical inactivation studies of food spoilage fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 27, 199-208.
- BRYDEN, W. L. (2007). Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 16, 95-101.
- BUCHELI, P. and TANIWAKI, M. H. (2002). Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. *Food Addit Contam*, 19, 655-65.
- BUDAVARI, S., O'NEIL, M. J., SMITH, A. and HECKELMAN, P. E. (1989). The Merck Index, Merck & Co. Inc., Rahway, NJ, 1008.
- CABAÑES, F. J., ACCENSI, F., BRAGULAT, M. R., ABARCA, M. L., CASTELLÁ, G., MINGUEZ, S. and PONS, A. (2002). What is the source of ochratoxin A in wine? *International journal of food microbiology*, 79, 213-215.
- CADDICK, M. X., BROWNLEE, A. G. and ARST JR, H. N. (1986). Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics MGG*, 203, 346-353.
- CAKIR, A., KORDALI, S., KILIC, H. and KAYA, E. (2005). Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 245-256.
- CANO-SANCHO, G., MARIN, S., RAMOS, A. and SANCHIS, V. (2009). Survey of patulin occurrence in apple juice and apple products in Catalonia, Spain, and an estimate of dietary intake. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 2, 59-65.
- CAO, B., NAGARAJAN, K. and LOH, K.-C. (2009). Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. *Applied microbiology and biotechnology*, 85, 207-228.
- CARIDI, A., GALVANO, F., TAFURI, A. and RITIENI, A. (2006). Ochratoxin A removal during winemaking. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 122-126.

- CARSON, C. F., MEE, B. J. and RILEY, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46, 1914-1920.
- CAST (2003). Council for Agriculture Science and Technology-Task force report.
- CASTELLARI, M., VERSARI, A., FABIANI, A., PARPINELLO, G. P. and GALASSI, S. (2001). Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3917-3921.
- CECCHINI, F., MORASSUT, M., MORUNO, E. G. and DI STEFANO, R. (2006). Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiology*, 23, 411-417.
- CHU, F. S. and LI, G. Y. (1994). Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Applied and environmental microbiology*, 60, 847-852.
- CIEGLER, A. (1972). Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. *Can. J. Microbiol.*, 631-636.
- CIEGLER, A., FENNELL, D., MINTZLAFF, H.-J. and LEISTNER, L. (1972). Ochratoxin synthesis by *Penicillium* species. *Naturwissenschaften*, 59, 365-366.
- CIEGLER, A. F., D.J.; SANSIG, G.A.; DETROY, R.W.; BENNETT, G.A. (1973). Mycotoxin-producing strains of *Penicillium viridactum*: Classification into subgroups,. *Appl Microbiol*, 271-278.
- COMMISSION, E. (2006). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. 2006R1881-EN-01.09. 2014-014.001-1.
- COMMISSION, E. E. (2004). Reports on tasks for scientific cooperation (SCOOP) Task 3.2. 11. *Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States Directorate General health and Consumer Protection*.
- CONNER, D. and BEUCHAT, L. (1984). Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal of food science*, 49, 429-434.
- CONNER, D., BEUCHAT, L., WORTHINGTON, R. and HITCHCOCK, H. (1984). Effects of essential oils and oleoresins of plants on ethanol production, respiration and sporulation of yeasts. *International journal of food microbiology*, 1, 63-74.
- COZZI, G., PERRONE, G., EPIFANI, F., PASCALE, M. and VISCONTI, A. (Year) Published. Epidemiology of ochratoxin A producing fungi in Apulian vineyards. XII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, 2007. 21-25.
- CRESPO-SEMPERE, A., MARIN, S., SANCHIS, V. and RAMOS, A. J. (2013). VeA and LaeA transcriptional factors regulate ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. *International journal of food microbiology*, 166, 479-86.
- CRESPO-SEMPERE, A., SELMA-LAZARO, C., PALUMBO, J. D., GONZALEZ-CANDELAS, L. and MARTINEZ-CULEBRAS, P. V. (2016). Effect of oxidant stressors and phenolic antioxidants on the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*. *J Sci Food Agric*, 96, 169-77.
- CRISTANI, M., D'ARRIGO, M., MANDALARI, G., CASTELLI, F., SARPIETRO, M. G., MICIELI, D., VENUTI, V., BISIGNANO, G., SAIJA, A. and TROMBETTA, D. (2007). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6300-6308.
- DA CRUZ CABRAL, L., FERNANDEZ PINTO, V. and PATRIARCA, A. (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International journal of food microbiology*, 166, 1-14.
- DAKOVIĆ, A., TOMAŠEVIĆ-ČANOVIĆ, M., DONDUR, V., ROTTINGHAUS, G. E., MEDAKOVIĆ, V. and ZARIĆ, S. (2005). Adsorption of mycotoxins by organozeolites. *Colloids and Surfaces B: biointerfaces*, 46, 20-25.

- DAKOVIĆ, A., TOMAŠEVIĆ-ČANOVIĆ, M., ROTTINGHAUS, G., DONDUR, V. and MAŠIĆ, Z. (2003). Adsorption of ochratoxin A on octadecyldimethyl benzyl ammonium exchanged-clinoptilolite-heulandite tuff. *Colloids and Surfaces B: biointerfaces*, 30, 157-165.
- DE BELLIS, P., TRISTEZZA, M., HAIDUKOWSKI, M., FANELLI, F., SISTO, A., MULÈ, G. and GRIECO, F. (2015). Biodegradation of ochratoxin A by bacterial strains isolated from vineyard soils. *Toxins*, 7, 5079-5093.
- DE COSTA, P. and BEZERRA, P. (2009). *Fungicides: Chemistry, Environmental Impact, and Health Effects*, Nova Biomedical Books.
- DEBERGHES, P., BETBEDER, A., BOISARD, F., BLANC, R., DELABY, J., KRIVOBOK, S., STEIMAN, R., SEIGLE-MURANDI, F. and CREPPY, E. (1995). Detoxification of ochratoxin A, a food contaminant: prevention of growth of *Aspergillus ochraceus* and its production of ochratoxin A. *Mycotoxin research*, 11, 37-47.
- DEBERGHES, P., DEFFIEUX, G., GHARBI, A., BETBEDER, A., BOISARD, F., BLANC, R., DELABY, J. and CREPPY, E. (1993). Detoxification de l'ochratoxine A par des moyens physiques, chimiques et enzymatiques. *Hum. Ochratoxocosis Pathol*, 231, 75-82.
- DENYER, S. and HUGO, W. (1991). Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. *Society for Applied Bacteriology. Technical Series*, 27, 171-187.
- DEVEGOWDA, G., RAJU, M., AFZALI, N. and SWAMY, H. (1998). Mycotoxin picture worldwide: novel solutions for their counteraction. *Feed Compounder (United Kingdom)*.
- DORN, G. (1965). Genetic analysis of the phosphatases in *Aspergillus nidulans*. *Genetical research*, 6, 13-26.
- DOSTER, R. and SINNHUBER, R. (1972). Comparative rates of hydrolysis of ochratoxins A and B in vitro. *Food and cosmetics toxicology*, 10, 389-394.
- DRUSCH, S. and RAGAB, W. (2003). Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. *Journal of Food Protection®*, 66, 1514-1527.
- EDRINGTON, T., KAMPS-HOLTZAPPLE, C., HARVEY, R., KUBENA, L., ELISSALDE, M. and ROTTINGHAUS, G. (1995). Acute hepatic and renal toxicity in lambs dosed with fumonisin-containing culture material. *Journal of animal science*, 73, 508-515.
- EL KHOURY, A. and ATOUI, A. (2010). Ochratoxin a: general overview and actual molecular status. *Toxins*, 2, 461-93.
- ELAROUSSI, M., MOHAMED, F., EL BARKOUKY, E., ATTA, A., ABDOU, A. and HATAB, M. (2006). Experimental ochratoxicosis in broiler chickens. *Avian Pathology*, 35, 263-269.
- ESPEJO, F. J. and ARMADA, S. (2009). Effect of activated carbon on ochratoxin A reduction in "Pedro Ximenez" sweet wine made from off-vine dried grapes. *European Food Research and Technology*, 229, 255-262.
- ESPESO, E. A., TILBURN, J., SÁNCHEZ-PULIDO, L., BROWN, C. V., VALENCIA, A., ARST, H. N. and PEÑALVA, M. A. (1997). Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *Journal of molecular biology*, 274, 466-480.
- FANELLI, F., SCHMIDT-HEYDT, M., HAIDUKOWSKI, M., GEISEN, R., LOGRIECO, A. and MULÈ, G. (2012). Influence of light on growth, conidiation and the mutual regulation of fumonisin B2 and ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus niger*. *World Mycotoxin Journal*, 5, 169-176.
- FAO-WHO (2013). PROPOSED DRAFT ANNEX FOR THE PREVENTION AND REDUCTION OF AFLATOXINS AND OCHRATOXIN A CONTAMINATION IN SORGHUM (CODE OF PRACTICE FOR THE PREVENTION AND REDUCTION OF MYCOTOXIN CONTAMINATION IN CEREALS (CAC/RCP 51-2003)). *Codex Alimentarius Commission*.
- FAO (2009). CODE OF PRACTICE FOR THE PREVENTION AND REDUCTION OF OCHRATOXIN A CONTAMINATION IN COFFEE. *CAC/RCP 69-2009*.
- FÄRBER, P. and GEISEN, R. (2004). Analysis of differentially-expressed ochratoxin A biosynthesis genes of *Penicillium nordicum*. *European journal of plant pathology*, 110, 661-669.

- FEIER, D. and TOFANA, M. (Year) Published. Ochratoxin A—Toxicological Aspects. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture*, 2009. University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, 308-312.
- FERRACIN, L. M., FIER, C. B., VIEIRA, M. L., MONTEIRO-VITORELLO, C. B., VARANI ADE, M., ROSSI, M. M., MULLER-SANTOS, M., TANIWAKI, M. H., THIE IAMANAKA, B. and FUNGARO, M. H. (2012). Strain-specific polyketide synthase genes of *Aspergillus niger*. *International journal of food microbiology*, 155, 137-45.
- FERRARA, M., GALLO, A., SCALZO, R. L., HAIDUKOWSKI, M., PICCHI, V. and PERRONE, G. (2015). Inhibition of ochratoxin A production in *Aspergillus carbonarius* by hydroxycinnamic acids from grapes. *World Mycotoxin Journal*, 8, 283-289.
- FERRARA, M., PERRONE, G., GAMBACORTA, L., EPIFANI, F., SOLFRIZZO, M. and GALLO, A. (2016). Identification of a Halogenase Involved in the Biosynthesis of Ochratoxin A in *Aspergillus carbonarius*. *Appl Environ Microbiol*, 82, 5631-41.
- FERREIRA, F., #XE1, DIAS, V., MOSSINI, S. A. G., FERREIRA, F. M. D., ARROT, #XE9, IA, C. C., DA COSTA, C. L., NAKAMURA, C. V. and MACHINSKI JUNIOR, M. (2013). The Inhibitory Effects of Curcuma longa L. Essential Oil and Curcumin on *Aspergillus flavus* Link Growth and Morphology. *The Scientific World Journal*, 2013, 6.
- FIRSVAD, J. and THRANE, U. (1996). Mycotoxin production by food-borne fungi. *Introduction to FoodBorne Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn, The Netherlands*, 251-260.
- FRISVAD, J. C. and FILTBORG, O. (1983). Classification of terverticillate penicillia based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Applied and environmental microbiology*, 46, 1301-1310.
- FRISVAD, J. C. and SAMSON, R. A. (2004). Penicillium subgenus Penicillium-A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. *Studies in Mycology*.
- FRISVAD, J. C. F., J.M.; HOUBRAKEN, J.A.M.P.; KUIJPERS, A.F.A.; SAMSON, R.A. (2004). New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Stud.. Mycol*, 23-43.
- FRISVAD, J. C. T., U.; SAMSON, R.A.; PIT, J.I. (2006). Important mycotoxins and the fungi which produce them. *Adv. Food mycol*, 3-31.
- FUCHS, S., SONTAG, G., STIDL, R., EHRLICH, V., KUNDI, M. and KNASMÜLLER, S. (2008). Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1398-1407.
- GAFFOOR, I. and TRAIL, F. (2006). Characterization of two polyketide synthase genes involved in zearalenone biosynthesis in *Gibberella zeae*. *Applied and environmental microbiology*, 72, 1793-1799.
- GALLO, A., BRUNO, K. S., SOLFRIZZO, M., PERRONE, G., MULE, G., VISCONTI, A. and BAKER, S. E. (2012). New insight into the ochratoxin A biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *Aspergillus carbonarius*. *Appl Environ Microbiol*, 78, 8208-18.
- GALLO, A., FERRARA, M. and PERRONE, G. (2013). Phylogenetic study of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of mycotoxins. *Toxins*, 5, 717-42.
- GALLO, A., KNOX, B. P., BRUNO, K. S., SOLFRIZZO, M., BAKER, S. E. and PERRONE, G. (2014). Identification and characterization of the polyketide synthase involved in ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. *International journal of food microbiology*, 179, 10-7.
- GAMBUTI, A., STROLLO, D., GENOVESE, A., UGLIANO, M., RITIENI, A. and MOIO, L. (2005). Influence of enological practices on ochratoxin A concentration in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56, 155-162.
- GARDINER, D. M. and HOWLETT, B. J. (2005). Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiology Letters*, 248, 241-248.
- GEISEN, R., MAYER, Z., KAROLEWIEZ, A. and FARBER, P. (2004). Development of a Real Time PCR system for detection of *Penicillium nordicum* and for monitoring ochratoxin A production in

- foods by targeting the ochratoxin polyketide synthase gene. *Systematic and applied microbiology*, 27, 501-7.
- GEISEN, R., SCHMIDT-HEYDT, M. and KAROLEWIEZ, A. (2006). A gene cluster of the ochratoxin A biosynthetic genes in *Penicillium*. *Mycotoxin research*, 22, 134-141.
- GIL-SERNA, J., GONZÁLEZ-SALGADO, A., GONZÁLEZ-JAÉN, M. T., VÁZQUEZ, C. and PATIÑO, B. (2009). ITS-based detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae* in grapes and green coffee beans by real-time quantitative PCR. *International journal of food microbiology*, 131, 162-167.
- GIL-SERNA, J., VÁZQUEZ, C., GONZÁLEZ-JAÉN, M. T. and PATIÑO, B. (2015). Clustered array of ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus steynii* and their expression patterns in permissive conditions. *International journal of food microbiology*, 214, 102-108.
- GILANI, S. H., BANCROFT, J. and REILY, M. (1978). Teratogenicity of ochratoxin A in chick embryos. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 46, 543-546.
- GOCMEN, A., PETERS, H., CRIPPS, D., MORRIS, C. and DOGRAMACI, I. (1985). Porphyria turcica: hexachlorobenzene-induced porphyria. *IARC scientific publications*, 567-573.
- GOLIŃSKI, P., HULT, K., GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, J., CHEŁKOWSKI, J., KNEBLEWSKI, P. and SZEBIOTKO, K. (1984). Mycotoxic porcine nephropathy and spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in kidneys and blood of Polish swine. *Applied and environmental microbiology*, 47, 1210-1212.
- HAIGHTON, L. A., LYNCH, B. S., MAGNUSSON, B. A. and NESTMANN, E. R. (2012). A reassessment of risk associated with dietary intake of ochratoxin A based on a lifetime exposure model. *Critical reviews in toxicology*, 42, 147-168.
- HALÁSZ, A., LÁSZTITY, R., ABONYI, T. and BATA, Á. (2009). Decontamination of mycotoxin-containing food and feed by biodegradation. *Food Reviews International*, 25, 284-298.
- HARRIS, J. P. and MANTLE, P. G. (2001). Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*, 58, 709-716.
- HASHEM, A., ABD-ALLAH, E. F., AL-OBEED, R. S., ALQARAWI, A. A. and ALWATHNANI, H. A. (2015). Effect of carbon, nitrogen sources and water activity on growth and ochratoxin production of *Aspergillus carbonarius* (bainier) thom. *Jundishapur journal of microbiology*, 8.
- HASKARD, C., BINNION, C. and AHOKAS, J. (2000). Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillushamnosus* strain GG. *Chemico-biological interactions*, 128, 39-49.
- HASKARD, C. A., EL-NEZAMI, H. S., KANKAANPÄÄ, P. E., SALMINEN, S. and AHOKAS, J. T. (2001). Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 67, 3086-3091.
- HAYES, A. W., MELTON, R. and SMITH, S. J. (1974). Effect of aflatoxin B1, ochratoxin and rubratoxin B on a protozoan, *Tetrahymena pyriformis* HSM. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 11, 321-325.
- HENDRICKSE, R., COULTER, J., LAMPLUGH, S., MACFARLANE, S., WILLIAMS, T., OMER, M. and SULIMAN, G. (1982). Aflatoxins and kwashiorkor: a study in Sudanese children. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 285, 843-846.
- HESSELTINE, C. W. V., E.E.; FENNELL, D.I., SMIT, /M./L.; SHOTWELL, O.L. (1972). Aspergilli as ochratoxin producers. *Mycologia*, 539-550.
- HEUSSNER, A. H. and BINGLE, L. E. (2015). Comparative ochratoxin toxicity: a review of the available data. *Toxins*, 7, 4253-4282.
- HONG, S. Y., ROZE, L. V., WEE, J. and LINZ, J. E. (2013). Evidence that a transcription factor regulatory network coordinates oxidative stress response and secondary metabolism in aspergilli. *Microbiologyopen*, 2, 144-160.
- HORIE, Y. (1995). Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *nigri*. *Nippon Kingakki Kaiho*, 73-76.

- HUA, H., XING, F., SELVARAJ, J. N., WANG, Y., ZHAO, Y., ZHOU, L., LIU, X. and LIU, Y. (2014). Inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus ochraceus* growth and ochratoxin A production. *PLoS one*, 9, e108285.
- HUFF, W., KUBENA, L., HARVEY, R. and PHILLIPS, T. (1992). Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A. *Poultry Science*, 71, 64-69.
- HUFF, W. E. and HAMILTON, P. B. (1979). Mycotoxins-their biosynthesis in fungi: Ochratoxins-metabolites of combined pathways. *Journal of Food Protection®*, 42, 815-820.
- HUFF, W. E., WYATT, R., TUCKER, T. and HAMILTON, P. (1974). Ochratoxicosis in the broiler chicken. *Poultry Science*, 53, 1585-1591.
- HUFFMAN, J., GERBER, R. and DU, L. (2010). Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide - derived mycotoxins. *Biopolymers*, 93, 764-776.
- HUSSEIN, H. S. and BRASEL, J. M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, 101-134.
- HWANGA, C.-A. and DRAUGHON, F. A. (1994). Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Food Protection®*, 57, 410-414.
- IARC (1993). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; World Health Organization: Lyon, France*, 56, 489-521.
- IBRAHIM, N. A., MOHAMMED, M., FARID, M. A. and ABDEL-WAHED, N. A. (2015). Chemical composition, antimicrobial and antifungal activities of essential oils of the leaves of *Aegle marmelos* (L.) Correa growing in Egypt.
- ISLAM, R., ZHOU, T., YOUNG, J. C., GOODWIN, P. H. and PAULS, K. P. (2012). Aerobic and anaerobic de-epoxydation of mycotoxin deoxynivalenol by bacteria originating from agricultural soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 7-13.
- ISMAIEL, A. A. and PAPENBROCK, J. (2014). The effects of patulin from *Penicillium vulpinum* on seedling growth, root tip ultrastructure and glutathione content of maize. *European journal of plant pathology*, 139, 497-509.
- JOINT, F. (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). *WHO food additives series*, 47.
- JOINT FAO/WHO CODEX ALIMENTARIUS, J. F. W. F. S. P., WORLD HEALTH ORGANIZATION (2003). *Codex Alimentarius: Food hygiene, basic texts*, Food & Agriculture Org.
- JORDAN, J. K. (2009). Ready-to-eat dry fruit products and process. Google Patents.
- JORGENSEN, K. (1998). Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food additives & contaminants*, 15, 550-554.
- JOUANY, J., YIANNIKOURIS, A. and BERTIN, G. (2009). Risk assessment of mycotoxins in ruminants and ruminant products. *Options Méditerranéennes*, A, 85, 205-224.
- KABAK, B. and DOBSON, A. D. (2009). Biological strategies to counteract the effects of mycotoxins. *Journal of Food Protection®*, 72, 2006-2016.
- KABAK, B., DOBSON, A. D. and VAR, I. L. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 593-619.
- KALEMBA, D. and KUNICKA, A. (2003). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 813-829.
- KANAPITSAS, A., BATRINOU, A., ARAVANTINOS, A., SFLOMOS, C. and MARKAKI, P. (2016). Gamma radiation inhibits the production of Ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius*. Development of a method for OTA determination in raisins. *Food Bioscience*, 15, 42-48.
- KAPETANAKOU, A. E., PANAGOU, E. Z., GIALITAKI, M., DROSINOS, E. H. and SKANDAMIS, P. N. (2009). Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* on culture medium and Corinth raisins. *Food Control*, 20, 725-732.

- KAROLEWIEZ, A. and GEISEN, R. (2005). Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic gene cluster of *Penicillium nordicum* and characterization of the ochratoxin polyketide synthase gene. *Systematic and applied microbiology*, 28, 588-95.
- KELLER, N. P., NESBITT, C., SARR, B., PHILLIPS, T. D. and BUROW, G. B. (1997). pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathology*, 87, 643-648.
- KELLER, N. P., TURNER, G. and BENNETT, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 937-947.
- KIM, D., YUKL, E. T., MOËNNÉ-LOCCOZ, P. and ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. (2006). Fungal heme oxygenases: functional expression and characterization of Hmx1 from *Saccharomyces cerevisiae* and CaHmx1 from *Candida albicans*. *Biochemistry*, 45, 14772-14780.
- KIM, J. H., YU, J., MAHONEY, N., CHAN, K. L., MOLYNEUX, R. J., VARGA, J., BHATNAGAR, D., CLEVELAND, T. E., NIERNAN, W. C. and CAMPBELL, B. C. (2008). Elucidation of the functional genomics of antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis. *International journal of food microbiology*, 122, 49-60.
- KOCIĆ-TANACKOV, S., DIMIĆ, G., TANACKOV, I., PEJIN, D., MOJOVIĆ, L. and PEJIN, J. (2012). The inhibitory effect of oregano extract on the growth of *Aspergillus* spp. and on sterigmatocystin biosynthesis. *LWT - Food Science and Technology*, 49, 14-20.
- KOVALSKY, P. (2014). Climate change and mycotoxin prevalence.
- KROGH, P., HALD, B., GJERTSEN, P. and MYKEN, F. (1974). Fate of ochratoxin A and citrinin during malting and brewing experiments. *Applied microbiology*, 28, 31-34.
- KROHN, K., BAHRAMSARI, R., FLÖRKE, U., LUDEWIG, K., KLICHE-SPORY, C., MICHEL, A., AUST, H.-J., DRAEGER, S., SCHULZ, B. and ANTUS, S. (1997). Dihydroisocoumarins from fungi: Isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity. *Phytochemistry*, 45, 313-320.
- KUIPER-GOODMAN, T. and SCOTT, P. M. (1989). Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed Environ Sci*, 2, 179-248.
- KUMAGAI, S. (1985). Ochratoxin A: Plasma concentration and excretion into bile and urine in albumin-deficient rats. *Food and Chemical Toxicology*, 23, 941-943.
- LARSEN, A. I., LAKSEN, A., JEPSEN, J. R. and JØRGENSEN, R. (1990). Contact allergy to the fungicide benomyl? *Contact dermatitis*, 22, 278-281.
- LARSEN, T. O. S., A.; SMEDSGAARD, J. (2001). Biochemical characterization of ochratoxin A-producing stains of the genus *Penicillium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 3630-3635.
- LEA, T., STEIEN, K. and STØRMER, F. C. (1989). Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathologia*, 107, 153-159.
- LEGAN, J. (2000). Cereals and cereal products. *The Microbiological Safety and Quality of Food*, 1, 759-783.
- LEONG, S.-L. L., HOCKING, A., PITI, J., KAZI, B., EMMETT, R. and SCOTT, E. S. (2006). Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. *International journal of food microbiology*, 111, S10-S17.
- LEONG, Y.-H., ISMAIL, N., LATIF, A. A. and AHMAD, R. (2010). Aflatoxin occurrence in nuts and commercial nutty products in Malaysia. *Food Control*, 21, 334-338.
- LI, S., MARQUARDT, R. R., FROHLICH, A. A., VITTI, T. G. and CROW, G. (1997). Pharmacokinetics of Ochratoxin A and Its Metabolites in Rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 145, 82-90.
- LLEWELLYN, G., O'DONNELL, W. and DASHEK, W. (1984). Aflatoxin influences on seed germination and root elongation by two cultivars of *Glycine max* and uptake of 65 Zn-ZnCl₂ by the cultivars. *Mycopathologia*, 86, 129-136.
- LUCINI, E., ZUNINO, M., LOPEZ, M. and ZYGADLO, J. (2006). Effect of Monoterpenes on Lipid Composition and Sclerotial Development of *Sclerotium cepivorum* Berk. *Journal of Phytopathology*, 154, 441-446.
- LUND, F. and FRISVAD, J. C. (2003). *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *Journal of applied microbiology*, 95, 1117-1123.

- LUNN, R. M., LANGLOIS, R. G., HSIEH, L. L., THOMPSON, C. L. and BELL, D. A. (1999). XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer research*, 59, 2557-2561.
- MA, Y. and WINK, M. (2008). Lobeline, a piperidine alkaloid from Lobelia can reverse P-gp dependent multidrug resistance in tumor cells. *Phytomedicine*, 15, 754-758.
- MAAROUFI, K., PFOHL-LESZKOWICZ, A., ACHOUR, A., EL MAY, M., GROSSE, Y., HAMMAMI, M., ELLOUZ, F., CREPPY, E. and BACHA, H. (1993). [Ochratoxin A genotoxicity, relation to renal tumors]. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 71, 21-31.
- MAGAN, N. and ALDRED, D. (2005). Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. *Food additives and contaminants*, 22, 10-16.
- MAGAN, N., SANCHIS, V. and ALDRED, D. (2004). Role of spoilage fungi in seed deterioration. *Fungal biotechnology in agricultural, food and environmental applications*, 311-323.
- MAHFOUD, R., MARESCA, M., GARMY, N. and FANTINI, J. (2002). The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 181, 209-218.
- MAHONEY, N. and MOLYNEUX, R. J. (2004). Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in Aspergillus flavus by constituents of walnut (*Juglans regia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1882-1889.
- MAJERUS, P. and KAPP, K. (2002). Reports on tasks for scientific cooperation. *Report of experts participating in Task*, 3.
- MALLY, A. (2012). Ochratoxin A and mitotic disruption: mode of action analysis of renal tumor formation by ochratoxin A. *Toxicological Sciences*, 127, 315-330.
- MALLY, A. and DEKANT, W. (2009). Mycotoxins and the kidney: modes of action for renal tumor formation by ochratoxin A in rodents. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 467-478.
- MALLY, A., KEIM-HEUSLER, H., AMBERG, A., KURZ, M., ZEPNIK, H., MANTLE, P., VÖLKEL, W., HARD, G. C. and DEKANT, W. (2005). Biotransformation and nephrotoxicity of ochratoxin B in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 206, 43-53.
- MARAGOS, C. (2010). Zearalenone occurrence and human exposure. *World Mycotoxin Journal*, 3, 369-383.
- MARIN, S., RAMOS, A., CANO-SANCHO, G. and SANCHIS, V. (2013). Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218-237.
- MARTÍN, J. F., CASQUEIRO, J., KOSALKOVÁ, K. and MARCOS, A. T. (1999). Penicillin and cephalosporin biosynthesis: mechanism of carbon catabolite regulation of penicillin production. *Antonie van Leeuwenhoek*, 75, 21-31.
- MARUYA, K., REDDY, V., HAYES, A. W. and BERNDT, W. O. (1982). Embryocidal, fetotoxic and teratogenic effects of ochratoxin A in rats. *Toxicology*, 25, 175-185.
- MCLEAN, M. (1996). The phytotoxicity of *Fusarium* metabolites: An update since 1989. *Mycopathologia*, 133, 163-179.
- MCLEAN, M., BERJAK, P., WATT, M. and DUTTON, M. (1992). The effects of aflatoxin B1 on immature germinating maize (*Zea mays*) embryos. *Mycopathologia*, 119, 181-190.
- MECA, G., BLAIOTTA, G. and RITIENI, A. (2010). Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. *Food Control*, 21, 579-583.
- MEDEIROS, F. H. V. D., MARTINS, S. J., ZUCCHI, T. D., MELO, I. S. D., BATISTA, L. R. and MACHADO, J. D. C. (2012). Biological control of mycotoxin-producing molds. *Ciência e Agrotecnologia*, 36, 483-497.
- MEDINA, Á., MATEO, R., VALLE-ALGARRA, F. M., MATEO, E. M. and JIMÉNEZ, M. (2007). Effect of carbendazim and physicochemical factors on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. *International journal of food microbiology*, 119, 230-235.
- MESCHINI, S., MARRA, M., CALCABRINI, A., FEDERICI, E., GALEFFI, C. and ARANCIA, G. (2003). Voacamine, a bisindolic alkaloid from *Peschiera fuchsiae* folia, enhances the cytotoxic effect of

- doxorubicin on multidrug-resistant tumor cells. *International Journal of Oncology*, 23, 1505-1513.
- MÜLLER, H. M. and AMEND, R. (1997). Formation and disappearance of mycophenolic acid, patulin, penicillic acid and PR toxin in maize silage inoculated with *Penicillium roqueforti*. *Archives of Animal Nutrition*, 50, 213-225.
- MURTHY, P. S., BORSE, B. B., KHANUM, H. and SRINIVAS, P. (2009). Inhibitory effects of Ajowan (*Trachyspermum ammi*) ethanolic extract on *A. ochraceus* growth and ochratoxin production. *Turkish Journal of Biology*, 33, 211-217.
- NAIDU, A., BIDLACK, W. and CLEMENS, R. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 13-126.
- NAPOLITANO, A., FOGLIANO, V., TAFURI, A. and RITIENI, A. (2007). Natural occurrence of ochratoxin A and antioxidant activities of green and roasted coffees and corresponding byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10499-10504.
- NELSON, P. E., DIGNANI, M. C. and ANAISSE, E. J. (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 479-504.
- NIDERKORN, V., MORGAVI, D., ABOAB, B., LEMAIRE, M. and BOUDRA, H. (2009). Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisin B1 and B2 by lactic acid bacteria. *Journal of applied microbiology*, 106, 977-985.
- NIELSEN, K. F., MOGENSEN, J. M., JOHANSEN, M., LARSEN, T. O. and FRISVAD, J. C. (2009). Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 1225-1242.
- NORRED, R. T. R. A. W. P. (1999). Mycotoxin prevention and decontamination – a case study on maize. *Atti Third Joint FAO/WHO/UNEP international conference on mycotoxins*.
- O'BRIEN, E. and DIETRICH, D. R. (2005). Ochratoxin A: the continuing enigma. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 35, 33-60.
- O'CALLAGHAN, J. (2003). A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology*, 149, 3485-3491.
- O'CALLAGHAN, J., STAPLETON, P. C. and DOBSON, A. D. (2006). Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 43, 213-21.
- OLIVARES-MARÍN, M., DEL PRETE, V., GARCIA-MORUNO, E., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, C., MACÍAS-GARCÍA, A. and GÓMEZ-SERRANO, V. (2009). The development of an activated carbon from cherry stones and its use in the removal of ochratoxin A from red wine. *Food Control*, 20, 298-303.
- OLSEN, M., JONSSON, N., MAGAN, N., BANKS, J., FANELLI, C., RIZZO, A., HAIKAR, A., DOBSON, A., FRISVAD, J. and HOLMES, S. (2003). Prevention of Ochratoxin A in Cereals. OTA PREV. Final Report. Quality of Life and Management of Living Resources. Project No. QLK1-CT-1999-00433.
- OMIDBEYGI, M., BARZEGAR, M., HAMIDI, Z. and NAGHDIBADI, H. (2007). Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, 18, 1518-1523.
- ONIONS, A., ALLSOPP, D. and EGGIN, H. (1981). Smith's Introduction to Industrial Mycology Edward Arnold. London, 1981.
- OVERY, D. P., SEIFERT, K. A., SAVARD, M. E. and FRISVAD, J. C. (2003). Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts. *International journal of food microbiology*, 88, 69-77.
- ÖZPINAR, H., AUGONYTE, G. and DROCHNER, W. (1999). Inactivation of ochratoxin in ruminal fluid with variation of pH-value and fermentation parameters in an in vitro system. *environmental toxicology and pharmacology*, 7, 1-9.

- PALUMBO, J. D., O'KEEFFE, T. L. and MAHONEY, N. E. (2007). Inhibition of ochratoxin A production and growth of Aspergillus species by phenolic antioxidant compounds. *Mycopathologia*, 164, 241-248.
- PARK, J. W., CHUNG, S.-H. and KIM, Y.-B. (2005). Ochratoxin A in Korean food commodities: occurrence and safety evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4637-4642.
- PASSAMANI, F. R. F., HERNANDES, T., LOPES, N. A., BASTOS, S. C., SANTIAGO, W. D., CARDOSO, M. D. G. and BATISTA, L. R. (2014). Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by Aspergillus niger and Aspergillus carbonarius from brazilian grapes. *Journal of Food Protection®*, 77, 1947-1952.
- PASSONE, M. A., GIRARDI, N. S. and ETCHEVERRY, M. (2012). Evaluation of the control ability of five essential oils against Aspergillus section Nigri growth and ochratoxin A accumulation in peanut meal extract agar conditioned at different water activities levels. *International journal of food microbiology*, 159, 198-206.
- PENALVA, M. A., TILBURN, J., BIGNELL, E. and ARST, H. N., JR. (2008). Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol*, 16, 291-300.
- PETCHKONGKAEW, A., TAILLANDIER, P., GASALUCK, P. and LEBRIHI, A. (2008). Isolation of Bacillus spp. from Thai fermented soybean (Thua - nao): screening for aflatoxin B1 and ochratoxin A detoxification. *Journal of applied microbiology*, 104, 1495-1502.
- PETRUZZI, L., BEVILACQUA, A., BAIANO, A., BENEDUCE, L., CORBO, M. and SINIGAGLIA, M. (2014a). In vitro removal of ochratoxin A by two strains of *Saccharomyces cerevisiae* and their performances under fermentative and stressing conditions. *Journal of applied microbiology*, 116, 60-70.
- PETRUZZI, L., CORBO, M. R., BAIANO, A., BENEDUCE, L., SINIGAGLIA, M. and BEVILACQUA, A. (2015). In vivo stability of the complex ochratoxin A-Saccharomyces cerevisiae starter strains. *Food Control*, 50, 516-520.
- PETRUZZI, L., SINIGAGLIA, M., CORBO, M. R., CAMPANELLO, D., SPERANZA, B. and BEVILACQUA, A. (2014b). Decontamination of ochratoxin A by yeasts: Possible approaches and factors leading to toxin removal in wine. *Applied microbiology and biotechnology*, 98, 6555-6567.
- PETTERSSON, H. (1995). Trichothecene occurrence in European cereals-a review. *Landbauforschung Voelkenrode. Sonderheft (Germany)*.
- PETZINGER, E. and WEIDENBACH, A. (2002). Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livestock Production Science*, 76, 245-250.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A. and MANDERVILLE, R. A. (2011). An update on direct genotoxicity as a molecular mechanism of ochratoxin a carcinogenicity. *Chemical research in toxicology*, 25, 252-262.
- PFOHL - LESZKOWICZ, A. and MANDERVILLE, R. A. (2007). Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 61-99.
- PFOHL - LESZKOWICZ, A., PINELLI, E., BARTSCH, H., MOHR, U. and CASTEGNARO, M. (1998). Sex - and strain - specific expression of cytochrome P450s in Ochratoxin A - induced genotoxicity and carcinogenicity in rats. *Molecular carcinogenesis*, 23, 76-85.
- PIETRI, A., BERTUZZI, T., PALLARONI, L. and PIVA IV, G. (2001). Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food additives & contaminants*, 18, 647-654.
- PIOTROWSKA, M. (2014). The adsorption of ochratoxin A by Lactobacillus species. *Toxins*, 6, 2826-2839.
- PIOTROWSKA, M. and ZAKOWSKA, Z. (2005). The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria strains. *Polish Journal of Microbiology*, 54, 279-286.
- PITT, J., BASILICO, J., ABARCA, M. and LOPEZ, C. (2000). Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical mycology*, 38, 41-46.

- PITT, J. I. (1987). *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 266-269.
- PRAKASH, B., KEDIA, A., MISHRA, P. K. and DUBEY, N. (2015). Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities—Potentials and challenges. *Food Control*, 47, 381-391.
- PRAKASH, B., SINGH, P., KEDIA, A. and DUBEY, N. (2012). Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and in vivo efficacy in food system. *Food Research International*, 49, 201-208.
- PUEL, O., GALTIER, P. and OSWALD, I. P. (2010). Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins*, 2, 613-631.
- RAI, M. K., BONDE, S. R., INGLE, A. P. and GADE, A. K. (2012). Mycotoxin: rapid detection, differentiation and safety. *Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 3, 22.
- REFAI, M., AZIZ, N., EL-FAR, F. and HASSAN, A. (1996). Detection of ochratoxin produced by *A. ochraceus* in feedstuffs and its control by γ radiation. *Applied radiation and isotopes*, 47, 617-621.
- REVERBERI, M., GAZZETTI, K., PUNELLI, F., SCARPARI, M., ZJALIC, S., RICELLI, A., FABBRI, A. A. and FANELLI, C. (2012). Aoyap1 regulates OTA synthesis by controlling cell redox balance in *Aspergillus ochraceus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 95, 1293-1304.
- REVERBERI, M., ZJALIC, S., PUNELLI, F., RICELLI, A., FABBRI, A. A. and FANELLI, C. (2007). Apyap1 affects aflatoxin biosynthesis during *Aspergillus parasiticus* growth in maize seeds. *Food additives and contaminants*, 24, 1070-1075.
- RHEE, S. G., WOO, H. A., KIL, I. S. and BAE, S. H. (2012). Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 4403-4410.
- RICHARD, J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *International journal of food microbiology*, 119, 3-10.
- RINGOT, D. C., A.; SCHNEIDER, Y.J.; LARONDELLE, Y. (2006). Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chem. Biol. Interact.*, 18-46.
- RISPAIL, N., SOANES, D. M., ANT, C., CZAJKOWSKI, R., GRÜNLER, A., HUGUET, R., PEREZ-NADALES, E., POLI, A., SARTOREL, E. and VALIANTE, V. (2009). Comparative genomics of MAP kinase and calcium–calcineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 287-298.
- RODRÍGUEZ, A., RODRÍGUEZ, M., LUQUE, M. I., JUSTESEN, A. F. and CÓRDOBA, J. J. (2011). Quantification of ochratoxin A-producing molds in food products by SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods. *International journal of food microbiology*, 149, 226-235.
- RODRIGUEZ, H., REVERON, I., DORIA, F., COSTANTINI, A., DE LAS RIVAS, B., MUÑOZ, R. and GARCIA-MORUNO, E. (2011). Degradation of ochratoxin a by *Brevibacterium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 10755-10760.
- ROMERO, S., ALBERTO, M. and VAAMONDE, G. (2010). Effect of gallic acid on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production. *World Mycotoxin Journal*, 3, 45-48.
- ROMERO, S. M., ALBERTO, M. R., MANCA DE NADRA, M. C. and VAAMONDE, G. (2009). Inhibition of growth and ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius* by flavonoid and nonflavonoid compounds. *Mycotoxin research*, 25, 165.
- RONNE, H. (1995). Glucose repression in fungi. *Trends in genetics*, 11, 12-17.
- ROSA, C., MAGNOLI, C., FRAGA, M., DALCERO, A. and SANTANA, D. (2004). Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food additives and contaminants*, 21, 358-364.
- RUIJTER, G. J. and VISSER, J. (1997). Carbon repression in Aspergilli. *FEMS Microbiology Letters*, 151, 103-114.
- RUMORA, L. and ŽANIĆ GRUBIŠIĆ, T. (2009). A journey through mitogen-activated protein kinase and ochratoxin A interactions. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 60, 449-455.

- RUSTOM, I. (1997). Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food chemistry*, 59, 57-67.
- SAMSON, R. A., NOONIM, P., MEIJER, M., HOUBRAKEN, J., FRISVAD, J. C. and VARGA, J. (2007). Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology*, 59, 129-145.
- SAMSON, R. A. H., J.A.M.P.; KUIPERS, A.F.A.; FRANK, J.M.; FRISVAD, J.C. (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud. Mycol.*, 45-61.
- SARTORI, D., MASSI, F. P., FERRANTI, L. S. and FUNGARO, M. H. P. (2014). Identification of genes differentially expressed between ochratoxin-producing and non-producing strains of *Aspergillus westerdijkiae*. *Indian journal of microbiology*, 54, 41-45.
- SATO, I., ITO, M., ISHIZAKA, M., IKUNAGA, Y., SATO, Y., YOSHIDA, S., KOITABASHI, M. and TSUSHIMA, S. (2012). Thirteen novel deoxynivalenol-degrading bacteria are classified within two genera with distinct degradation mechanisms. *FEMS Microbiology Letters*, 327, 110-117.
- SAVINO, M., LIMOSANI, P. and GARCIA-MORUNO, E. (2007). Reduction of ochratoxin A contamination in red wines by oak wood fragments. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 97-101.
- SCHATZMAYR, G., HEIDLER, D., FUCHS, E. and BINDER, E.-M. (2012). Microorganism for biological detoxification of mycotoxins, namely ochratoxins and/or zearalenons, as well as method and use thereof. Google Patents.
- SCHATZMAYR, G., HEIDLER, D., FUCHS, E., BINDER, E., LOIBNER, A. and BRAUN, R. (2002). Evidence of ochratoxin A-detoxification activity of rumen fluid, intestinal fluid and soil samples as well as isolation of relevant microorganisms from these environments. *Mycotoxin research*, 18, 183-187.
- SCHATZMAYR, G., HEIDLER, D., FUCHS, E., NITSCH, S., MOHNL, M., TÄUBEL, M., LOIBNER, A., BRAUN, R. and BINDER, E. (2003). Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxin A. *Mycotoxin research*, 19, 124-128.
- SCHATZMAYR, G., ZEHNER, F., TÄUBEL, M., SCHATZMAYR, D., KLIMITSCH, A., LOIBNER, A. P. and BINDER, E. M. (2006). Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50, 543-551.
- SCHMIDT-HEYDT, M., GRAF, E., BATZLER, J. and GEISEN, R. (2011a). The application of transcriptomics to understand the ecological reasons of ochratoxin a biosynthesis by *Penicillium nordicum* on sodium chloride rich dry cured foods. *Trends in Food Science & Technology*, 22, S39-S48.
- SCHMIDT-HEYDT, M., GRAF, E., STOLL, D. and GEISEN, R. (2012). The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. *Food Microbiology*, 29, 233-241.
- SCHMIDT-HEYDT, M., RÜFER, C., RAUPP, F., BRUCHMANN, A., PERRONE, G. and GEISEN, R. (2011b). Influence of light on food relevant fungi with emphasis on ochratoxin producing species. *International journal of food microbiology*, 145, 229-237.
- SCHMIDT-HEYDT, M., STOLL, D., SCHÜTZ, P. and GEISEN, R. (2015). Oxidative stress induces the biosynthesis of citrinin by *Penicillium verrucosum* at the expense of ochratoxin. *International journal of food microbiology*, 192, 1-6.
- SCHNEIDER, E. P. and DICKERT, K. J. (1994). Health Costs and Benefits of Fungicide Use in Agriculture: A Literature Review. *Journal of Agromedicine*, 1, 19-37.
- SCHWARZER, D. and MARAHIEL, M. A. (2001). Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften*, 88, 93-101.
- SCOTT, P. (1996). Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A: introduction. *Food additives and contaminants*, 13, 19-21.
- SIKKEMA, J., DE BONT, J. and POOLMAN, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological reviews*, 59, 201-222.
- SILVA, A., GALLI, R., GRAZIOLI, B. and FUMI, M. D. (2003). Metodi di riduzione di residui di ocratossina A nei vini. *Industrie delle bevande*, 32, 467-472.
- ŠIMOVIĆ, M., DELAŠ, F., GRADVOL, V., KOCEVSKI, D. and PAVLOVIĆ, H. (2014). Antifungal effect of eugenol and carvacrol against foodborne pathogens *Aspergillus carbonarius* and *Penicillium*

- roqueforti in improving safety of fresh-cut watermelon. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 3, 91-96.
- SKAUG, M. A. (1999). Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. *Food additives & contaminants*, 16, 75-78.
- ŠKRINJAR, M., RAŠIĆ, J. L. and STOJIČIĆ, V. (1996). Lowering of ochratoxin A level in milk by yoghurt bacteria and bifidobacteria. *Folia microbiologica*, 41, 26-28.
- SOLEAS, G. J., YAN, J. and GOLDBERG, D. M. (2001). Assay of ochratoxin A in wine and beer by high-pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2733-2740.
- SOLIMAN, K. and BADEAA, R. (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxicogenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 1669-1675.
- SPARRINGA, R. and OWENS, J. (1999). Glucosamine content of tempe mould, Rhizopus oligosporus. *International journal of food microbiology*, 47, 153-157.
- STANDER, M. A., STEYN, P. S., VAN DER WESTHUIZEN, F. H. and PAYNE, B. E. (2001). A kinetic study into the hydrolysis of the ochratoxins and analogues by carboxypeptidase A. *Chemical research in toxicology*, 14, 302-304.
- STOEV, S. (1998). The role of ochratoxin A as a possible cause of Balkan endemic nephropathy and its risk evaluation. *Veterinary and human toxicology*, 40, 352-360.
- STOEV, S. D., DENEV, S., DUTTON, M. F., NJOBEH, P. B., MOSONIK, J. S., STEENKAMP, P. A. and PETKOV, I. (2010a). Complex etiology and pathology of mycotoxic nephropathy in South African pigs. *Mycotoxin research*, 26, 31-46.
- STOEV, S. D. and DENEV, S. A. (2013). Porcine/chicken or human nephropathy as the result of joint mycotoxins interaction. *Toxins*, 5, 1503-1530.
- STOEV, S. D., DUTTON, M. F., NJOBEH, P. B., MOSONIK, J. S. and STEENKAMP, P. A. (2010b). Mycotoxic nephropathy in Bulgarian pigs and chickens: complex aetiology and similarity to Balkan Endemic Nephropathy. *Food additives and contaminants*, 27, 72-88.
- STOLL, D., SCHMIDT-HEYDT, M. and GEISEN, R. (2013). Differences in the Regulation of Ochratoxin A by the HOG Pathway in Penicillium and Aspergillus in Response to High Osmolar Environments. *Toxins*, 5, 1282.
- STRIJBIS, K. and DISTEL, B. (2010). Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism. *Eukaryotic cell*, 9, 1809-1815.
- STUDER-ROHR, I., DIETRICH, D. R., SCHLATTER, J. and SCHLATTER, C. (1995). The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Food and Chemical Toxicology*, 33, 341-355.
- SWEENEY, M. J. and DOBSON, A. D. (1998). Mycotoxin production by Aspergillus, Fusarium and Penicillium species. *International journal of food microbiology*, 43, 141-158.
- TANGNI, E., PONCHAUT, S., MAUDOUX, M., ROZENBERG, R. and LARONDELLE, Y. (2002). Ochratoxin A in domestic and imported beers in Belgium: occurrence and exposure assessment. *Food additives & contaminants*, 19, 1169-1179.
- TANGNI, E., SIMONIS, J., LARONDELLE, Y. and DE MEEUS, D. (2005). Decontaminating and detoxifying liquid food media, especially beer, using insoluble vegetable fibers to adsorb mycotoxins. *Patent number WO2005007794-A1*.
- TATSADJIEU, N., DONGMO, P. J., NGASSOUM, M., ETOA, F. and MBOFUNG, C. (2009). Investigations on the essential oil of Lippia rugosa from Cameroon for its potential use as antifungal agent against Aspergillus flavus Link ex. Fries. *Food Control*, 20, 161-166.
- THIMM, N., SCHWAIGHOFER, B., OTTNER, F., FRÖSCHL, H., GREIFENENDER, S. and BINDER, E. (2001). Adsorption of mycotoxins. *Mycotoxin research*, 17, 219-223.
- THOMAS B.T., O. M. O., AGU G.C., LAKUNLE O.M., DAVIES A. (2015). In Silico Sequence Analysis of Pks Gene of Ochratoxin A Producing Aspergillus Section Nigri. *International Journal of Genetics* (2): 48-52.

- TILBURN, J., SARKAR, S., WIDDICK, D., ESPESO, E., OREJAS, M., MUNGROO, J., PENALVA, M. and ARST JR, H. (1995). The Aspergillus PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid-and alkaline-expressed genes by ambient pH. *The EMBO Journal*, 14, 779.
- TIAMOS, S., ANTONIOU, P., KAZANTZIDOU, A., ANTONOPOULOS, D., PAPAGEORGIOU, I. and TIAMOS, E. (2004). Aspergillus niger and Aspergillus carbonarius in Corinth Raisin and Wine - Producing Vineyards in Greece: Population Composition, Ochratoxin A Production and Chemical Control. *Journal of Phytopathology*, 152, 250-255.
- TOLOUEE, M., ALINEZHAD, S., SABERI, R., ESLAMIFAR, A., ZAD, S. J., JAIMAND, K., TAEB, J., REZAEE, M.-B., KAWACHI, M., SHAMS-GHAHFAROKHI, M. and RAZZAGHI-ABYANEH, M. (2010). Effect of Matricaria chamomilla L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of Aspergillus niger van Tieghem. *International journal of food microbiology*, 139, 127-133.
- TRIONÉ, D. and DUMEAU, F. (2000). Influence de différents traitements sur la concentration en ochratoxine A des vins rouges. *Revue des oenologues et des techniques vitivinicole et oenologiques: magazine trimestriel d'information professionnelle*, 27, 37-38.
- TRIPATHI, A., SHARMA, N. and SHARMA, V. (2009). In vitro efficacy of Hyptis suaveolens L.(Poit.) essential oil on growth and morphogenesis of Fusarium oxysporum f. sp. gladioli (Massey) Snyder & Hansen. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 503-512.
- TRIVEDI, A. B., DOI, E. and KITABATAKE, N. (1992). Detoxification of ochratoxin A on heating under acidic and alkaline conditions. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56, 741-745.
- VALERO, A., OLIVÁN, S., MARÍN, S., SANCHIS, V. and RAMOS, A. J. (2007). Effect of intra and interspecific interaction on OTA production by A. section Nigri in grapes during dehydration. *Food Microbiology*, 24, 254-259.
- VAN DER MERWE, K., STEYN, P., FOURIE, L., SCOTT, D. B. and THERON, J. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by Aspergillus ochraceus Wilh.
- VAN DER MERWE, K. J. S., P.S.; FOURIE, L.; SCOTT, D.B.; THERON, J.J. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 1112-1113.
- VAN WALBEEK, W. S., P.M.; HARWIG, J; LAWRENCE, J.W. (1969). A new source of ochratoxin A. *A. Can. J. Microbiol*, 1281-1285.
- VAR, I., KABAK, B. and ERGINKAYA, Z. (2008). Reduction in ochratoxin A levels in white wine, following treatment with activated carbon and sodium bentonite. *Food Control*, 19, 592-598.
- VARGA, J., KEVEI, E., RINYU, E., TÉREN, J. and KOZAKIEWICZ, Z. (1996). Ochratoxin production by Aspergillus species. *Applied and environmental microbiology*, 62, 4461-4464.
- VARGA, J., RIGÓ, K. and TÉREN, J. (2000). Degradation of ochratoxin A by Aspergillus species. *International journal of food microbiology*, 59, 1-7.
- VARGA, J. K., E.; RINYU, E.; TÉREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z. (1996). Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 4461-4464.
- VELDHUIZEN, E. J., TJEERDSMA-VAN BOKHOVEN, J. L., ZWEIJZER, C., BURT, S. A. and HAAGSMAN, H. P. (2006). Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1874-1879.
- VERGER, P., VOLATIER, J. and DUFOUR, A. (1999). Estimation des niveaux théoriques d'ingestion d'aflatoxines et d'ochratoxine. *Les mycotoxines dans l'alimentation: Evaluation et gestion du risque*, 371-384.
- VETTORAZZI, A., GONZÁLEZ-PEÑAS, E. and DE CERAIN, A. L. (2014). Ochratoxin A kinetics: A review of analytical methods and studies in rat model. *Food and Chemical Toxicology*, 72, 273-288.
- VETTORAZZI, A., VAN DELFT, J. and DE CERAIN, A. L. (2013). A review on ochratoxin A transcriptomic studies. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 766-783.
- VISCONTI, A., PERRONE, G., COZZI, G. and SOLFRIZZO, M. (2008). Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. *Food additives and contaminants*, 25, 193-202.
- WANG, L., WANG, Y., WANG, Q., LIU, F., SELVARAJ, J. N., LIU, L., XING, F., ZHAO, Y., ZHOU, L. and LIU, Y. (2015). Functional characterization of new polyketide synthase genes involved in ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus* fc-1. *Toxins*, 7, 2723-2738.

- WEGST, W. and LINGENS, F. (1983). Bacterial degradation of ochratoxin A. *FEMS Microbiology Letters*, 17, 341-344.
- WINK, M. (2012). Secondary metabolites from plants inhibiting ABC transporters and reversing resistance of cancer cells and microbes to cytotoxic and antimicrobial agents. *Frontiers in microbiology*, 3, 130.
- WINK, M. and SCHIMMER, O. (2010). Molecular modes of action of defensive secondary metabolites. *Functions and biotechnology of plant secondary metabolites*, 39, 21-161.
- XIAO, H., MARQUARDT, R. R., FROHLICH, A. A. and LING, Y. Z. (1995). Synthesis and structural elucidation of analogs of ochratoxin A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 524-530.
- YIN, W. and KELLER, N. P. (2011). Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. *The Journal of Microbiology*, 49, 329-339.
- YOU, M., WICKRAMARATNE, D. B., SILVA, G. L., CHAI, H., CHAGWEDERA, T. E., FARNSWORTH, N. R., CORDELL, G. A., KINGHORN, A. D. and PEZZUTO, J. M. (1995). (-)-Roemerine, an aporphine alkaloid from Annona senegalensis that reverses the multidrug-resistance phenotype with cultured cells. *J Nat Prod*, 58, 598-604.
- YU, J., CHANG, P.-K., EHRLICH, K. C., CARY, J. W., BHATNAGAR, D., CLEVELAND, T. E., PAYNE, G. A., LINZ, J. E., WOLOSHUK, C. P. and BENNETT, J. W. (2004). Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and environmental microbiology*, 70, 1253-1262.
- ZHANG, X. B. and OHTA, Y. (1991). Binding of mutagens by fractions of the cell wall skeleton of lactic acid bacteria on mutagens. *Journal of dairy science*, 74, 1477-1481.
- ZIMMERLI, B. and DICK, R. (1996). Ochratoxin A in table wine and grape - juice: Occurrence and risk assessment*. *Food additives & contaminants*, 13, 655-668.
- ZINEDINE, A., SORIANO, J. M., MOLTO, J. C. and MANES, J. (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1-18.